BEITRÄGE ZUR BIOLOGIE
DES
BACTERIUM PRODIGIOSUM
UND
ZUM CHEMISCHEN VERHALTEN SEINES PIGMENTES.

Inaugural-Dissertation

verfasst und der

Hohen philosophischen Facultät

der

Königl. Bayer. Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der Doctorwürde

vorgelegt

am 12. April 1902

von

Ernst Kraft

aus

Hohenmölsen

Apothekenbesitzer zu Bad Kissingen.

ACAD. LUDOVIC. BAT. BIBL.

WÜRZBURG.

Druck von Memminger's Buchdruckerei & Verlagsanstalt.

1902.

Meiner lieben Frau Hedwig

gewidmet.

Einleitung.

Bereits im Jahre 1899 wurde von *Wulf Wladimir Rosenberg* unter Leitung von Herrn Prof. *Dr. K. B. Lehmann* im Hygienischen Institute zu Würzburg der Versuch gemacht, die chemische Beschaffenheit des Farbstoffes von Bact. prod. weiter aufzuklären. Wenn auch diese Untersuchungen manches Neue brachten, mussten sie doch viele der wichtigsten Fragen offen lassen, und ich griff daher auf Anregung von Herrn Professor *Lehmann* dieses Thema wieder auf, in der Hoffnung, wenigstens einige chemische und biologische Fragen auf diesem Gebiete ihrer Lösung näher zu bringen. Dass mir dies bis zu einem gewissen Grade gelungen ist, dürfte ein Blick auf meine Schlusssätze lehren. Bei den grossen, z. T. ungeahnten Schwierigkeiten, welche namentlich der rein chemische Teil darbot, ist es aber wohl zu entschuldigen, wenn auch ich — wie so viele meiner Vorarbeiter —, nur wieder Beiträge liefere, Irrtümer aufkläre, Neues zufüge, ohne imstande zu sein, die schwierigen Probleme sämtlich abschliessend zu lösen.

Was die Arbeit in chemischer Richtung anbetrifft, so wurde dieselbe ausserordentlich erschwert durch

die enorme Empfindlichkeit des Farbstoffes Säuren und Alkalien gegenüber, wie ich später beweisen werde. Die minimalsten Spuren störten eine ganze Reihe von Versuchen in unangenehmster Weise. Im weiteren Verlaufe der Arbeit kam dann noch der nicht geahnte Einfluss des Wassers auf ätherische und alkoholische Pigmentlösungen hinzu. Endlich schlugen auch alle Versuche, den Körper krystallinisch zu erhalten, völlig fehl.

Eine Aufzählung der über das Studium des Bacterium prodigiosum vorliegenden Literatur darf ich an dieser Stelle wohl übergehen, da dieselbe eingehend von *Scheurlen* (Archiv für Hygiene, Band 26, pag. 1) und *W. W. Rosenberg* („Beiträge zur Kenntnis der Bacterienfarbstoffe, insbesondere zur Gruppe des Bacterium prodigiosum", Med. Dissertation, Würzburg 1899) zusammengestellt ist, sodann, weil mir überhaupt nur die Arbeiten von *Erdmann* (Journal für praktische Chemie, pag. 385—407, Leipzig 1866), *Schneider* (Klein und Migula, Arbeiten an dem bacteriologischen Institut zu Karlsruhe Heft 2), *Scheurlen, Rosenberg* und *Schottelius* („Biologische Untersuchungen über den Micrococcus prodigiosus", Leipzig 1887, S. 185) einer ernsthaften Beachtung wert schienen, mit deren Ergebnissen ich meine Resultate verglichen habe.

Nicht erwähnt hat *Scheurlen* sowohl wie *Rosenberg* und alle anderen Forscher der letzten Jahrzehnte die bereits 1819 von dem Venetianer *Bartolmeo Bizio* in Italien gemachten biologischen Studien über Bact. prodig. *Spica* hat 1900 eine kurze Zusammenstellung seiner biologischen und chemischen Erfahrungen beim

Studium dieses Bacteriums erscheinen lassen („Sulla materia colorante prodotta dal Micrococcus prodigiosus di P. Spica, M. E. Atti del reale instituto Veneto di scienze, lettere ed arti", Ser. 8. T. 2. 1899/1900. Disp. 10), worin er *Bizio* die Priorität gewisser biologischen Beobachtungen sichert und einige kleine Details hinzufügt, auf die ich teilweise später zurückkommen werde.

Anlage der Culturen zur Farbstoffgewinnung. Biologische Einflüsse (Rasse, Licht, Temperatur, Nährboden) auf die Farbstoffbildung der Culturen.

Das hygienische Institut stellte mir für meine Arbeit sechs verschiedene Culturen zur Verfügung, nämlich:

1. Bact. prodig., bezogen von *Kral.*
2. „ „ „ „ *Dr. R. O. Neumann* (Kiel)
3. „ „ „ „ *Dr. Honl* (Prag)
4. „ indicum.
5. „ minaceum und
6. „ Kiliense, letztere drei aus der Institutssammlung),

die nach den Untersuchungen von *Lehmann* und *Neumann* und *Rosenberg* sämtlich mit Bact. prodig. nächst verwandt, wenn nicht identisch sind.

Es galt nun zunächst festzustellen, welche Cultur einerseits den schönsten Farbstoff lieferte und andererseits zu wissen, welches Bacterium am üppigsten wuchs. Letztere Bedingung war von ziemlicher Wichtigkeit, da eine grössere Menge von Farbstoff (namentlich in der ersten Zeit, d. h., bis ich eine bessere Herstellungs-Methode gefunden hatte), nur schwierig zu gewinnen war. Nach wenigen Versuchen ergab sich, dass der

von *Dr. Neumann* erhaltene Stamm von Bact. prod. alle anderen geprüften Culturen soweit übertraf, dass ich nur mit diesem arbeitete. Die von ihm erhaltenen Culturen ergaben 1900 und 1901 ergiebiges Pigment, ihr Wachstum nahm aber nach und nach so ab, dass ich von 1902 ab mit einem neuen, von *Kral*-Prag bezogenen Stamm arbeiten musste.

Als Nährsubstrat benutzte ich in den ersten Monaten ausschliesslich Kartoffelscheiben, da nach den früher im Institute wie von anderen Autoren gemachten Versuchen sich diese Art der Züchtung am vorteilhaftesten erwiesen hatte. Die Kartoffel hat ausserdem die angenehme Eigenschaft, dass sich die dunkelfarbigen Culturen ziemlich bequem und sauber von den glatten Scheiben abstreifen liessen.

Ich verfuhr in der bekannten Weise, dass ich möglichst grosse Kartoffeln auswählte, und zwar Sorten, welche nicht mehlig waren, damit sie nicht während des Sterilisierens zerfielen. Dieselben wurden sauber gewaschen, abgespült und geschält, abermals gut abgewaschen und in ca. 1,5 cm dicke Scheiben geschnitten. Die mit destilliertem Wasser abgespülten Scheiben brachte ich sodann zu je 2—4 Stück in nicht zu flachen Petrischalen in den Dampfsterilisierapparat, worin sie zweimal je zwei Stunden verblieben. Die Sterilisation musste sehr sorgfältig und andern Tags nochmals vorgenommen werden, um die im Boden weit verbreiteten, schwer abtötbaren Sporen des Bazillus mesentericus und seiner Verwandten vollständig zu vernichten. Gewöhnlich bleiben nämlich bei der ersten Sterilisation die Sporen dieses Bazillus noch vollständig

intact und keimen sofort zu neuen Bazillen aus. Eine zweite Sterilisation vernichtet dann fast stets die neuentstandenen Bazillen.

Alsdann erfolgte die Impfung. Die Culturen wurden erst bei der schwankenden Zimmertemperatur gezüchtet, nach längerem Arbeiten stellte sich dann heraus, dass eine Temperatur von 22° C. für das Wachstum am günstigsten war, und um diese constant zu haben, wurden die Petrischalen im 22°-Schrank aufgestellt.

Was nun bei dem Weiterimpfen auf Kartoffeln vor allem als sehr merkwürdig auffiel, war der auch schon von *Lehmann* und *Neumann* beschriebene eigentümliche Farbenwechsel der Culturen. Dieselben zeigten alle Farbenübergänge von dunklem Kirschrot bis zu hellem Zinnoberrot und Orangegelb, und zwar trat diese Mannigfaltigkeit selbst auf ein und derselben Kartoffelscheibe auf, indem z. B. die Hauptmasse nach der Mitte zu dunkelrot, der ganze Rand hingegen ockergelb wuchs, oder man fand nach dem Abheben der helleren Partieen darunter dunklere, kirschrote Schichten. —

Einige Forscher haben geglaubt, dass an der verschiedenen Farbe der Culturen die Reaktion derselben schuld sei. Ich will schon an dieser Stelle bemerken — ich komme später eingehender auf diesen Punkt zurück — dass in der That der Alkaligehalt jedenfalls aber dabei die Hauptrolle spielt, doch reagiren Kartoffelculturen stets alkalisch. Anfügen möchte ich hier auch noch, dass ich auf sehr alten Reisculturen (über 14 Tage alt) des öfteren eine saure Reaktion konstatieren konnte; die Färbung derselben — blaurot —

stimmte mit diesem Ergebnis völlig überein. Ich komme auf diese Ausnahme später zurück.

Die Annahme jener Forscher, den Farbenunterschied mit der Reaktion der Culturen in Zusammenhang zu bringen, ist erklärlich, wenn man bedenkt, wie leicht man bei den Culturen künstlich einen Farbenwechsel herbeiführen kann. Ich will dafür hier nur einige Beweise bringen.

Hält man eine rote Cultur, gleichviel auf welchem Substrat sie gewachsen ist, nur für wenige Sekunden über ein Ammoniak-Gefäss, so wird sie gelb und umgekehrt sofort wieder rot, wenn man sie vom Gefäss entfernt. — Sehr anschaulich wird der gleiche Versuch, wenn man etwas von roter Cultur in ein weisses Porzellanschälchen bringt und mit einem Tropfen Ammoniak betupft. Die Cultur färbt sich augenblicklich scharf orangerot, die ursprüngliche Farbe kehrt aber auch hier sehr bald zurück, obwohl noch lange hinterher eine äusserst starke alkalische Reaktion der Cultur nachgewiesen werden kann! Der Farbenumschlag wurde noch beschleunigt, wenn man auf die Cultur blies oder die Schale schnell hin- und herbewegte. Dass hier also thatsächlich nur dem Ammoniak die Beeinflussung der Farbe zugeschrieben werden muss, ist wohl selbstverständlich. —

Die Frage, ob und wie weit das Licht einen Einfluss auf die verschiedene Farbe der Culturen und in zweiter Linie auch auf das Wachstum derselben ausübt, musste hierbei natürlich ebenfalls untersucht werden. Nach der vorliegenden Literatur ist sie bis

heute so gut wie unberücksichtigt geblieben. Ich habe nun nach dieser Richtung hin eine reichliche Anzahl Versuche angestellt und gefunden, dass jener Einfluss, was zunächst den Farbenunterschied anbetrifft, ein nicht zu unterschätzender war. Eine hell-orangerote Kartoffelcultur setzte ich in einer Petrischale in ein Südfenster ohne Vorhänge dem vollen Tages- resp. Sonnenlichte aus. Bereits nach fünf Stunden war dieselbe schwarzrot geworden, und zwar ging dieser Farbenumschlag durch die ganze Tiefe der Cultur. Ich habe diese 1900 wiederholt angestellten Versuche 1901 und 1902 mit frischen Culturen von ganz anderen Stämmen wiederholt und stets dasselbe Resultat erzielt, d. h. die anfänglich orangerote Farbe wurde von Tag zu Tag dunkler rot, schliesslich tief braunrot, sodann ganz unansehnlich, gleich als ob die Cultur abgestorben sei und sich der Farbstoff völlig zersetzt habe. Ich habe jedoch am 14. Tage von dieser Cultur weiter auf Kartoffel geimpft, und damit wieder üppige, schön orangerote Culturen von tadelloser Beschaffenheit erhalten, ein Beweis, dass also mindestens ein Absterben der Bacterien nicht stattgefunden hatte. Uebrigens verhielt sich zu meiner grossen Verwunderung die nach ca. sechs Wochen erst vom Substrat entfernte, scheinbar total zersetzte, missfarbige Cultur, Alkohol, Aether, Alkali und Säuren gegenüber völlig normal und gab die entsprechenden Lösungen — vergl. die betr. Kapitel — in denselben Farbennuancen wie tadelloses frisches Pigment.

Reisculturen verhielten sich bei dem gleichen Versuche genau so. Es trat auch hier ein Dunkler-

und Missfarbigwerden der Culturen ein, nur war hier die Endnuance mehr blaurot als schwarzrot, da wohl hier — vergl. später — die Säurebildung eine weit ergiebigere war.

In der Arbeit von *Bizio* findet man übrigens auch die Bemerkung, dass das Licht keine Zersetzung des Pigmentes hervorrufe, „so lange letzteres mit dem Pflänzchen vereinigt sei". Die obigen Versuche bestätigen also voll und ganz die Wahrnehmung.

Ich schliesse hier einige interessante Beobachtungen an, die ich mit Reisculturen 1900 gemacht habe, als ich damals im Grossen arbeitete und gewöhnlich gegen hundert Schalen auf einmal impfte. Ich setzte hier die Hälfte bei 22° C. in den (dunklen) Brutschrank, während ich die anderen beim Tageslichte bei ähnlicher Zimmertemperatur stehen liess. Es wuchsen nun mehrmals fast alle im Dunklen befindliche Culturen tiefpurpurrot, die am Licht cultivierten mehr orangefarben. Constant war aber dieser Befund leider nicht zu erhalten.

In Kursen von Professor *Lehmann* machten die Färbungen der von ca. 50 Herren angelegten Agarstichculturen bisweilen den Eindruck, als ob die dem Fenster nähergestandenen Culturen besser gefärbt seien — dunkelcarmin statt rosa — ; in anderen Kursen war aber wieder davon keine Andeutung zu bemerken.

Wichtiger wäre wohl die Frage, ob bei Lichtabschluss das Wachstum des Bacteriums ein ergiebigeres ist. Die Versuche, welche ich bezüglich dieses Punktes anstellte, ergaben das Resultat, dass es sich völlig gleich blieb, ob ich bei Lichtabschluss

arbeitete, oder die Culturen dem Tageslichte aussetzte. Hier scheint abgesehen vom Substrat und der Güte des Stammes offenbar allein die Temperatur von Einfluss zu sein. Bedeutend ist jedoch dieser Einfluss sicher nicht, ich habe nur gefunden, dass das Wachstum bei 22° C. ein schnelleres ist als über und unter dieser Temperatur. Als Endergebnis erhielt man aber bei nicht genauem Einhalten dieser Temperatur nicht etwa einen geringeren Ertrag, sondern man war nur gezwungen, die Culturen einige Tage länger auf dem betreffenden Substrat wachsen zu lassen, um dieselbe Menge Farbstoff zu erhalten. Man konnte die Temperatur ziemlich erniedrigen, ohne dass das Wachstum des Bacteriums empfindlicher zu leiden hatte, nur wuchsen die Bacterien unter 6° C. ohne Farbe; wurde jedoch eine solche farblose Cultur wieder einige Zeit bei höherer Temperatur aufgestellt, so kehrte die Farbe allmählich wieder zurück. — Ich habe auch nach *Schottelius* den Einfluss einer höheren Temperatur geprüft. Frischgeimpfte Kartoffeln wurden in Petrischalen in den Brutschrank eingestellt und hier zunächst bei 34° C. während 36 Stunden stehen gelassen. Es zeigte sich nun nach Verlauf dieser Zeit, dass sich die Cultur wohl ziemlich gut entwickelt hatte, dass aber nicht eine Spur von Farbstoff auf derselben zu bemerken war. Ich stellte sodann die Schalen (nach wie vor vor Licht geschützt) bei ca. 16° C. im Zimmer auf, und schon nach 24 Stunden war der schöne Farbstoff wieder vorhanden und zeigte auch wieder den noch zu besprechenden Metallglanz. Eine höhere Temperatur schien somit das Wachstum des Bac-

teriums nicht oder doch nur unbedeutend zu beeinträchtigen, hingegen die Farbstoffbildung zu stören. Ich habe die Versuche alsdann auch mit Reis-Gelatine- und Agar-Agar-Nährböden fortgesetzt und gefunden, dass das Bact. prod. mit Farbe zwischen 8° und 28° C., ohne Farbe von ca. 29°—45° C. wächst. Darüber hinaus ist das Wachstum nur noch ein ganz spärliches. Im Wesentlichen habe ich hier nur bestätigt, was vor mir von Forschern wie *Schottelius, Scheurlen* und *Dieudonné* bereits festgestellt worden ist.

Ich komme nunmehr auf den Metallglanz zu sprechen, welchen ich sehr schön namentlich auf Kartoffeln wiederholt beobachten konnte. Auf diesem Substrat zeigte er sich gewöhnlich am intensivsten, stark grüngoldig schimmernd. Ganze Wochen lang trat derselbe oft nur schwach auf, dann wieder nahm er an Intensität ganz erheblich zu, namentlich vom dritten Tage des Wachstums der Cultur an. Sehr häufig war er aber nach 3—4fachem Weiterimpfen ganz verschwunden. Ganz dieselben Urculturen liessen den Glanz 1901, nachdem sie ihn über 12 Monate bald stärker, bald schwächer gebildet hatten, mehr als zwei Monate lang überhaupt nicht mehr auftreten. Ich habe während dieser Zeit alle mir zur Verfügung stehenden Culturen der Institutssammlung deshalb von neuem abgeimpft und zwar auf Kartoffel, Reis, Gelatine und Agar-Agar, Licht und Temperatur wurden gewechselt, der Glanz war und blieb aber verschwunden. Bei einer Uebertragung auf Reismehl jedoch trat er zu meinem Erstaunen plötzlich wieder auf. Zunächst waren damals alle 18 Reisschalen ohne Glanz ge-

wachsen, am fünften Tage jedoch bemerkte ich auf drei der Schalen den Glanz. Auch beim Weiterimpfen auf Kartoffel habe ich ihn alsdann noch zweimal wieder erhalten, dann blieb er wieder völlig aus. Es dürfte nach Obigem wohl schwer sein, zu erklären, wenn der Glanz überhaupt auftritt, was sein Erscheinen begründet, und aus welchen Ursachen er so häufig ausbleibt. Zu jenen 18 Schalen mit Reismehl z. B. hatte ich mir einen Liter Bouillon auf einmal hergestellt, sodass jede Schale genau dasselbe Substrat enthielt, auch war von derselben Cultur auf alle abgeimpft worden, und dennoch wuchsen nur ein kleiner Bruchteil mit Metallglanz, alle anderen ohne solchen.

Nach wiederholt gemachten Versuchen kann ich blos als sicher feststellen, dass Trockenheit der Substrat-Oberfläche die Bildung des Glanzes ganz entschieden begünstigt.

Ich komme nunmehr zu einer anderen Erscheinung, die wohl Jedem, der sich mit diesem Bacterium beschäftigt, einmal vorkommen wird. Die Culturen zeigen des öfteren nämlich einen hellen, schleimigen, wässerigen Belag, der meist nur noch blass gefärbt ist, so dass schliesslich die Pigmentbildung ganz aufhört. Im allgemeinen trat diese Bildung wenigstens bei Kartoffel) nach der fünften oder sechsten Weiterimpfung von Kartoffel zu Kartoffel ein, so dass man dann gezwungen war, für weitere Impfungen zur Urcultur zurückzugreifen. Ich schreibe diese Degeneration in erster Linie der Einförmigkeit des Nährbodens zu. Denn dieses wenig angenehme Resultat wurde, wenn auch nicht ganz sicher vermieden, so

doch meist weiter hinausgeschoben, wenn man den Nährboden wechselte, d. h. wenn z. B. von Kartoffel auf Agar, Reis oder Macaroni übergeimpft und erst dann wieder Kartoffel benutzt wurde. Ich habe dann späterhin gewöhnlich nach der fünften Impfung diesen Wechsel vorgenommen.

Scheurlen hat die von ihm mehrfach beobachtete Verschleimung der Culturen auf Kartoffeln auf eine Einwirkung des Ammoniaks auf die äusseren Schichten der Bacterien bezogen. Ich habe darüber keine eigenen Studien gemacht, doch möchte ich bemerken, dass ich durch zweierlei Factoren das Schleimigwerden nicht unwesentlich beschleunigen konnte, nämlich einmal, wenn ich absichtlich zu hohe Temperaturen anwandte, sodann, wenn ich auf Substrat impfte, welches zu feucht war (s. oben).

Endlich muss ich hier noch erwähnen, dass Jedem beim Arbeiten mit den Culturen der charakteristische Heringsgeruch auffällt, den *Scheurlen* auf Methylamin nicht Trimethylamin zurückgeführt hat. Derselbe trat gewöhnlich bei der von dem Urstamm abgeimpften Cultur energischer auf als wie bei Material, welches schon wiederholt von Kartoffel zu Kartoffel weitergeimpft war. Bei Milch-Reisculturen machte sich der Methylamingeruch nur in den ersten Tagen des Wachstums und weit schwächer bemerkbar. Es ist dies sicher auf die schon öfters betonte reichlichere Säurebildung auf diesem Nährboden zurückzuführen.

Im allgemeinen habe ich nach sechs bis acht Tagen die Culturen von den Nährböden entfernt, da ich nicht bemerkte, dass sich dieselben alsdann noch vermehrten.

Oefters war aber auch schon am dritten Tage das Wachstum ein so üppiges, dass man die Culturen abschaben konnte.

Um das Impfmaterial übrigens auf den Kartoffelscheiben besser verteilen zu können, machte ich auch wie *Rosenberg* einen Versuch mit Bouillon, indem ich in derselben das Aussaatmaterial fein verteilte und mit einem Platinpinsel auf die sterilisierten Kartoffelscheiben auftrug. Es stellte sich sehr bald indes heraus, dass ein wenig zuviel Flüssigkeit sehr störend wirkte, indem die Cultur schleimig, unansehnlich und wenig ergiebig wuchs (s. o.). Jedenfalls schien mir diese Methode keine Vorteile zu haben.

Eine lange Zeit habe ich das Bacterium auf Bouillonreis gezüchtet, und ich erhielt häufig von einer Schale etwa ebensoviel Farbstoff, wie von 10 Schalen Kartoffeln. Reis wurde hier in Bouillon und wenig Milch aufgequollen, kurze Zeit aufgekocht und alsdann in Petrischalen ebenfalls zweimal sterilisiert. Das Wachstum ging in derselben Zeit wie auf Kartoffel vor sich. Die Culturmasse liess sich auch ziemlich gut abnehmen, wenn der Reis genügend dick eingekocht war, und mitgerissene Nährbodenpartikel wurden, wie weiter unten gezeigt wird, bequem entfernt. Aber auch hier war ein öfteres Zurückimpfen auf Kartoffel nötig. Leider wuchs nämlich in vielen späteren Versuchen auf Reisnährböden, die wie oben beschrieben hergestellt waren, das Bacterium nur noch mit schlechter Farbstoffbildung, während parallele Culturen auf Kartoffel prächtigen Farbstoff bildeten. Sehr empfindlich störte oft ferner, dass auf Reisnährböden der Farb-

stoff, wie schon erwähnt, durch die starke Säurebildung eine dunkelblaurote Nuance annahm, denn ich glaubte, verpflichtet zu sein, meine Culturen so einzurichten, dass ich den schön carminroten „Normal-Farbstoff“ erhielt.

Später habe ich Knorr'sches Reismehl (ähnlich wie früher *Migula* verfahren) mit kalter sterilisierter Bouillon zu einem Brei angerührt, sterilisiert und geimpft. Ich erhielt dabei wohl ein herrliches Pigment, obwohl von wenig ansehnlicher Kartoffel-Cultur abgeimpft worden war, jedoch war die Dicke des Belages nur eine geringe. Alsdann setzte ich die Nähr-Bouillon heiss dem Reismehl zu. Ich bekam nun natürlich keinen dünnflüssigen Brei, sondern einen ziemlich guten, dicken Kleister. Das Resultat war jetzt aber, dass das Bact. prodig. auf diesem Substrat ausserordentlich prächtig gedieh und nicht nur einen tiefroten, sondern vor allem auch einen erfreulich dicken Pigmentbelag bildete. Kontrollversuche mit kalter und heisser Bouillon nebeneinander bestätigten das erhaltene Resultat, so dass ich nicht anstehe, jetzt die Erklärung abzugeben, dass nach meiner Erfahrung der in dieser Form hergestellte Nährboden für das Bact. prodigios. offenbar der allergünstigste ist.

Ein Versuch, rote Rüben als Nährboden zu verwenden, hatte gar keinen Erfolg, denn es zeigte sich gleich bei der ersten Impfung der unangenehme Schleim, und dass Pigment fiel ganz hell und lange nicht so schön und ergiebig aus, wie auf Kartoffel.

Ich habe auch versucht, das Bact. prod. auf Nähr-Gelatine zu züchten. Gelatine eignet sich aus

mancherlei Gründen jedoch nicht als Nährboden für dieses Bacterium, denn einmal liess die hellrote Farbe der Culturen stets von vornherein auf keine besondere Ausbeute schliessen, sodann aber war das Wachstum der Culturen ein lange nicht so reichliches wie auf den bisherigen Nährböden, so dass ich von 100 Petrischalen kaum soviel Pigment erhielt, wie von 30 mit Kartoffeln gefüllten. Endlich bereitete aber auch die rasche Verflüssigung des ganzen Nährbodens grosse Schwierigkeiten. Man kann also dieses Substrat für die Gewinnung grösserer Pigmentmengen absolut nicht empfehlen, abgesehen davon, dass Gelatine-Culturen zu ihrer Herstellung grössere Kosten machen und mehr Zeit in Anspruch nehmen als Kartoffel-Culturen.

Die Resultate auf Nähr-Agar waren genau ebenso ungünstig. Nicht nur, dass die Culturen auf diesem Substrate langsamer wie auf Kartoffel und Reis wuchsen, war auch die Gesamtmenge des schliesslich gewonnenen Pigmentes, obwohl ich die Culturen statt am 8. Tage erst am 12. abkratzte, sehr wenig zufriedenstellend. Ausserdem waren dieselben schwierig von dem Substrate zu trennen. Agar eignet sich also ebensowenig zur grösseren Pigmentgewinnung wie Gelatine.

Bemerken möchte ich nun noch zum Schluss, dass nach den soeben gemachten Versuchen des in dem Institute ebenfalls arbeitenden Herrn *Dr. Sano* die Farbstoffbildung des Bact. prodigiosum durch einen Zusatz von Tyrosin ausserordentlich begünstigt wird. Ich sah hier bei einem Zusatz von 0,05 gr Tyrosin auf 10 gr. Nährflüssigkeit (Gelatine, Agar-Agar etc.), dass

die gebildete Farbstoffmenge oft eine 6 mal grössere war, als in nicht mit Tyrosin versetzten Röhrchen.

Untersuchungen über den Stoffwechsel der weissen und roten Rasse von Bacterium prodigiosum.

Bekanntlich wachsen die Culturen der Gruppe dieses Bacteriums unter absolut gleichen Bedingungen nicht immer gleichmässig rot gefärbt. So wuchsen bisweilen sogar von völlig roten Culturen abgeimpfte Colonien unvorhergesehen plötzlich weiss oder doch sehr blass, gleichviel welcher Nährboden verwandt oder welche Temperatur bei dem Versuch geherrscht hatte. Auch das Licht schien dabei gar keine Rolle zu spielen. Während es nun aber oft gelang, beim Weiterimpfen noch 2—3—4—5 mal hintereinander helle, kaum schwach rosa gefärbte Culturen zu erhalten, wurden sie oft ganz plötzlich wieder rot, namentlich, wenn man den Nährboden wechselte.

Selbstverständlich drängte sich im Anfang mehrfach die Frage auf, ob die sogenannte weisse Prodigiosum-Cultur wirklich und ausschliesslich nur rein aus einer weissen Varietät von Bacterium prodigiosum bestände, oder ob es sich um eine Verunreinigung desselben mit einer weissen, dasselbe überwuchernden Art handelte. Die Frage wurde mehrfach mit Hilfe von Plattenculturen untersucht und immer an den farblosen Culturen alle makroscopischen und mikroscopischen, morphologischen Merkmale constatiert, welche die roten auszeichnen. Stets auch war der Methylamingeruch an den farblosen Culturen zu beob-

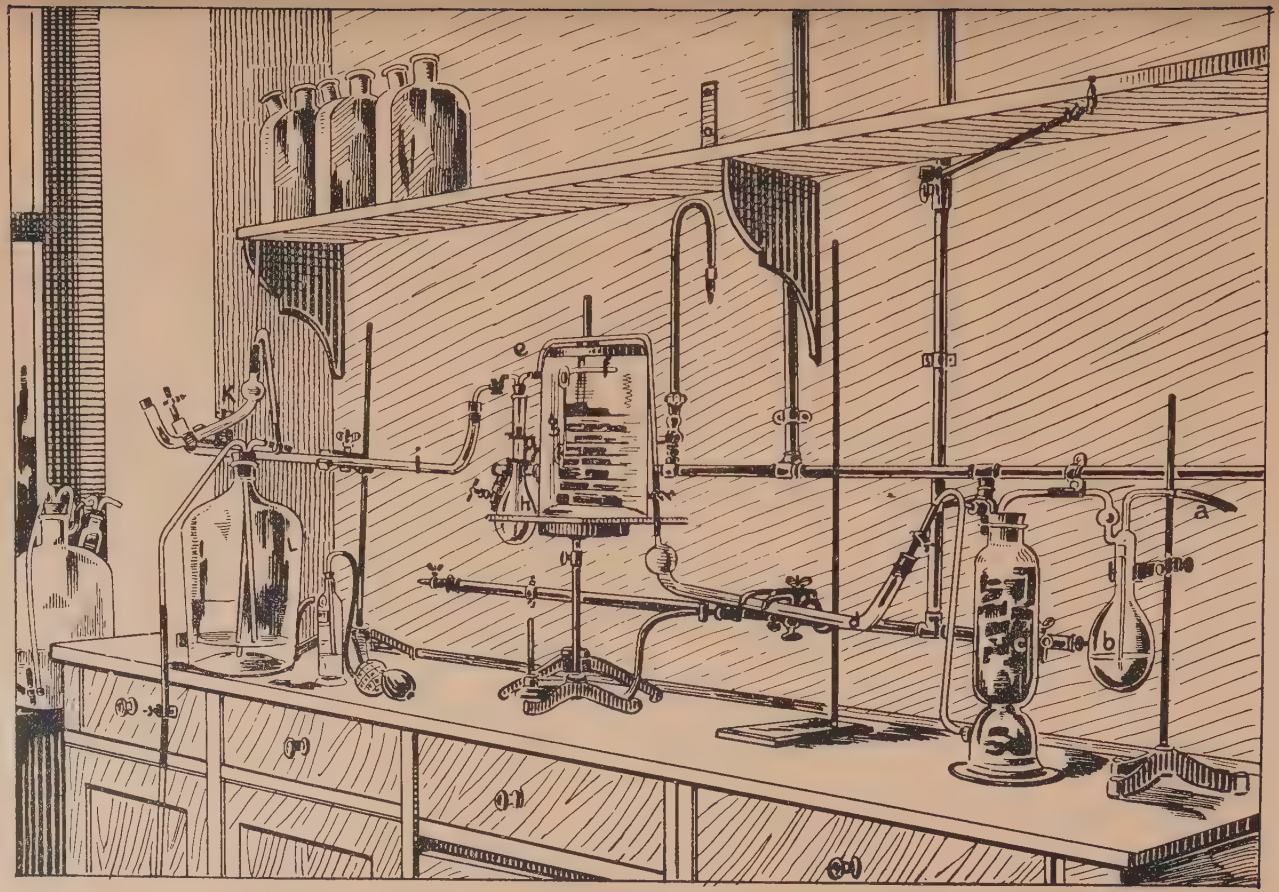
achten.[1]) Ich glaube also mit Bestimmtheit versichern zu können, dass wirklich meine weissen Stämme von Verunreinigung frei waren. Auffallend war, namentlich bei den älteren, farblosen Culturen, ihre stark zähe, fadenziehende Beschaffenheit, was ich in gleicher Weise bei roten Culturen nie gesehen habe.

Es schien von grossem Interesse, die Stoffwechselversuche an Bact. prodig. gleichzeitig mit einer intensiv Farbstoff bildenden und mit einer weissen Rasse anzustellen, um ein Urteil zu gewinnen, ob die fehlende Pigmentbildung als Zeichen einer allgemeinen Schädigung der Art aufgefasst werden dürfe, oder ob die Sache nicht vielmehr so liege, dass die Eigenschaft der Pigmentbildung ganz unabhängig von den übrigen Eigenschaften ist. Herr Prof. *Lehmann* hatte bei diesen Versuchen ausserdem die Aufgabe gestellt, den Einfluss der verschiedenen Nährböden auf die Bildung von Kohlensäure und Ammoniak zu ermitteln. Es sollten dabei zwei stärkereiche Nährböden (Reis und Kartoffel) mit zwei stärkearmen (Agar und Gelatine) verglichen werden.

Die sämtlichen Versuche wurden gleichzeitig mit gleich alten, gleichmässig geimpften und gleich zahlreichen Culturen von weissen und roten Stämmen angestellt, die Zimmertemperatur war stets 15—20° Celsius.

Ich begann meine Versuche, nachdem die Colonien 48 Stunden alt waren. Ich brachte je neun mit roten und weissen Culturen beimpfte Petrischalen unter je eine Glasglocke — vergl. die Zeichnung —. Dieselbe

[1]) *Schottelius* bemerkt entgegengesetzt: „Mit dem Verlust der Farbe verliert sich auch der Geruch nach Trimethylamin".



Apparat zur Kohlensäure- und Ammoniak-Bestimmung.

hatte eine Oeffnung, in welche zwei Glasrohre einmündeten. Durch das eine Rohr sollte Luft in *f* einströmen, weshalb es oben endigte, während durch das andere in *g* die Luft ausströmen sollte, und mit ihr die entwickelten Gase. Da die schwere Kohlensäure sich jedenfalls am Boden befand, endigte das zweite Rohr ganz unten. Der Luftstrom, welcher mittels eines Aspirators durch die Glocken geführt werden sollte, musste natürlich zuvor von seiner eigenen Kohlensäure befreit sein. Zu diesem Zwecke passierte er zuerst in *b* ein Kölbchen mit starker Natronlauge, in welches durch das Rohr *a* die Luft eintreten konnte, dann die Vorlage *c* mit Natron-Bimstein. Von hier aus ging der Luftstrom durch die Pettenkofer'sche Röhre *d*, die mit Barytwasser angefüllt war. Durch diese drei Vorlagen wurde es ermöglicht, dass in *f* eine völlig kohlensäurefreie Luft eintrat. Zum Beweise dessen blieb das Barytwasser in *d* völlig klar.

Es mussten nun Vorkehrungen getroffen werden, damit nicht etwa in die Glasglocke direkt Luft einströmte. Nachdem sie daher mit den neun offenen Petrischalen beschickt war, wurde sie luftdicht auf eine rauhe Glasplatte mittels Talg aufgesetzt. Ihr äusserer Rand wurde alsdann zur Vorsicht noch mit geschmolzenem Paraffin verstrichen. Stets wurde durch einen Kontroll-Versuch nachgewiesen, dass thatsächlich ein luftdichter Verschluss erzielt worden war.

Die aus der Glocke ausgesaugte Luft trat zunächst in den Glaskolben *h* ein, der mit 25 ccm $^1/_5$ Normal-Schwefelsäure beschickt war, sodass hier das gebildete Ammoniak und die Amine, soweit sie in die Luft über-

gingen, zurückgehalten wurden. Alsdann trat der Luftstrom in zwei Pettenkofer'sche Röhren ein; zunächst in die grössere *i*, welche 300 ccm titriertes Barytwasser enthielt und von da in die kleinere *k*, die mit 100 ccm desselben Barytwassers beschickt war. Das kleinere Rohr wurde deshalb eingeschaltet, um stets die Sicherheit zu haben, dass auch thatsächlich alle entwickelte Kohlensäure durch das Rohr *i* absorbiert war. So lange also durch die zuletzt durch Rohr *k* streichenden Luftblasen das Wasser keinerlei Trübung annahm, hatte man die gewünschte Garantie.

An das kleinere Rohr schloss sich endlich der Aspirator *l*, der mit einer federnden Schlauchklemme verbunden war. Wurde diese geöffnet, so trat der Apparat in Funktion, und die Luft strich in ununterbrochener Folge in Form feiner Bläschen durch das Barytwasser hindurch. Am Apparat bemerkt man noch eine ganze Reihe von kleinen Klemmen, mittelst deren jeder einzelne Teil für sich völlig abgeschlossen werden konnte.

Vor Beginn eines jeden neuen Versuches wurden die inzwischen gebildeten Gase aus den Glocken herausgetrieben, indem ich mittels eines Doppelgebläses während 15 Minuten einen kohlensäurefreien Luftstrom durch die Glocken leitete, nachdem vorher die Verbindung derselben nach beiden Richtungen gelöst war. Die Kohlensäuremenge, die ev. am Schluss des Versuchs in den Glocken zurückblieb, vernachlässigte ich. Die Diskussion des dadurch vielleicht entstandenen Fehlers veranlasste mich vor Abschluss meiner Arbeit, entsprechende Kontrollversuche anzustellen. Es wurden hier bei jedem Versuche, der den ganzen Tag an-

dauerte, gegen 50 Liter Luft durch den Apparat getrieben. Das Resultat war von dem früher erhaltenen nicht verschieden.

Es wäre offenbar unrichtig, anzunehmen, dass Kohlensäure und Ammoniak von den Culturen vollständig abgegeben wurden. Bei der grossen Menge der gebildeten Kohlensäure schien die Bestimmung der zurückgehaltenen Spuren unwesentlich., hingegen musste das Ammoniak, von dem — vgl. die Tabellen — nur so kleine Mengen frei vorhanden waren, auch in seiner gebundenen Form ermittelt werden. -- Weiter war erforderlich, den präexistierenden Ammoniakgehalt der reinen Nährböden auf ähnliche Weise festzustellen. Ich teile die erhaltene Resultate tabellarisch mit:

Ammoniak-Mengen, aus dem nicht geimpften Nährboden gewonnen.

Es wurde stets dieselbe Menge (9 Schalen) Nährboden untersucht und gefunden:

a)	Bei Kartoffel-Nährboden	11,90 mgr	NH_3
b)	„ Reismehl-Nährboden	9,86 „	„
c)	„ Bouillon-Reis-Nährboden	9,02 „	„
d)	„ Gelatine-Nährboden	6,46 „	„
e)	„ Agar-Nährboden	5,98 „	„

Als Beispiel für jede Berechnung wähle ich den Versuch I.

1. Kohlensäure-Berechnung.

Das Barytwasser war dargestellt durch Auflösen von 9 mgr Baryumhydroxyd und 0,5 gr Chlorbaryum in einem Liter Wasser.

Zur Berechnung der Kohlensäure entleerte ich am Ende des Versuchs nach gutem Durchmischen die grosse Pettenkofer'sche Röhre — die kleine war noch völlig klar — in ein Glas, verkorkte und liess die Flüssigkeit absetzen. Alsdann hob ich mittels Pipette 25 ccm ab und titrierte dieselben mittels $^1/_{10}$ N. Schwefelsäure. Vorher hatte ich natürlich das angewandte Barytwasser titriert und gefunden, dass 25 ccm desselben 13,6 ccm $^1/_{10}$ N. Schwefelsäure brauchten. Die abgehobenen 25 ccm brauchten nur 8,5 ccm, mithin war noch Barytwasser entsprechend 5,1 ccm $^1/_{10}$ N. Schwefelsäure übrig. Da das Rohr 300 ccm Barytwasser enthielt, war 5,1 mit 12 zu multiplizieren, das ergab 61,2. Nun entspricht 1 ccm $^1/_{10}$ N. Säure 2,2 mgr Kohlensäure, alo die gefundene Menge von 61,2 ccm = 135,52 mgr Kohlensäure.

2. Berechnung des gasförmig abgegebenen Ammoniaks.

Die vorgelegten 25 ccm $^1/_5$ N. Schwefelsäure wurden, nachdem sie einmal aufgekocht waren (um ev. festgehaltene, kleine Mengen Kohlensäure zu entfernen), mit $^1/_5$ N. Natronlauge titriert (Indikator war Luteol).

Vorgelegt waren 25 ccm $^1/_5$ N. Schwefelsäure
Verbraucht wurden 24,5 „ „ „ „
Es war also NH_3
gebunden = 0,5 „ „ „ „

Es entspricht aber 1 ccm $^1/_5$ N. Schwefelsäure 3,4 mgr Ammoniak, folglich obige 0,5 ccm = 1,7 mgr Ammoniak. Dabei ist alles Amin als Ammoniak gerechnet. Bei den kleinen absoluten Zahlen schien eine Trennung unerspriesslich.

3. Berechnung des im Nährboden gebundenen Ammoniaks. (Nach *Schlösing*.)

Ich verfuhr dabei folgendermassen: Nach Entfernen der Glocken wurden die Petrischalen vom Substrat entleert und die roten und weissen Culturen genau in je zwei Teile geteilt. Jeder Teil wurde sodann mit einer gleichen Menge Kalkmilch gemischt und über der Mischung im Exsiccator je ein Schälchen mit 25 ccm $^1/_5$ N. Schwefelsäure aufgestellt, der Exsiccator wurde gut geschlossen und bei Seite gestellt.

Am 8. Tage wurde alsdann titriert in derselben Weise, wie ich es vorher angegeben habe.

Es wurden so erhalten (vergl. Versuch III) [1])

a) bei dem roten Stamm auf Kartoffel:

Schale I 63,45
Schale II 61,71 i/Sa. 125,16 mgr NH_3
Davon als präexistierend subtrahiert 11,90 „ „
Somit wurden gebildet 113,26 mgr NH_3

b) bei dem weissen Stamm auf Kartoffel:

Schale I 54,92
Schale II 57,38 i/Sa. 112,30 mgr NH_3
Davon als präexistierend subtrahiert 11,90 „ „
Somit wurden gebildet 100,40 mgr NH_3

[1]) Bei Versuch I und II ist das *Schlösing*'sche Verfahren nicht angewandt worden.

I. Versuch auf Kartoffel.

Die Culturen waren auf je neun Petrischalen gewachsen; ihre Oberfläche repräsentierte bei den roten, wie bei den weissen Colonien 3,15 qdcm Fläche:

Alter der Cultur	Zeitdauer des Versuchs	Litermenge d. durchgestrichenen Luft	Temperatur	Es wurden gebildet, berechnet in Milligramm:							
				während d. ganz. Versuchs an CO_2		Also pro Std. an CO_2		während d. ganz. Versuchs an NH_3		Also pro Std. an NH_3	
				roter Stamm	weisser Stamm	roter Stamm	weisser Stamm	roter Stamm	weisser Stamm	roter Stamm	weisser Stamm
III. Tag	4 Std.	16	15 ° C.	135,52	200,64	33,88	50,16	1,70	2,72	0,42	0,68
IV. Tag	3 Std.	12	18 ° C.	117,18	207,36	39,06	69.12	1,32	1,98	0,44	0,66
V. Tag	2 Std.	10	17 ° C.	64,68	112,64	32,34	56,32	0,58	1,20	0,29	0,60

II. Versuch auf Kartoffel. (Angestellt mit denselben Mengen.)

III. Tag	6 Std.	20	18 ° C.	157,92	287,84	26,32	44,64	1,32	1,02	0,22	0,17
IV. Tag	3 Std.	11	17 ° C.	98,04	153,12	32,68	51,04	0,68	0,69	0,34	0,23
V. Tag	3 Std.	12	20 ° C.	66,—	142,56	22,—	47,52	0,54	0,62	0,18	0,21

III. Versuch auf Kartoffel.

Alter der Cultur	Zeitdauer des Versuchs	Litermenge d. durchgestrichenen Luft	Temperatur	Es wurden gebildet, berechnet in Milligramm: Während d. ganz. Versuchs an CO_2 roter Stamm	weisser Stamm	Also pro Std. an CO_2 roter Stamm	weisser Stamm	Während d. ganz. Versuchs an NH_3 roter Stamm	weisser Stamm	Also pro Std. an NH_3 roter Stamm	weisser Stamm
III. Tag	2 Std.	12	19° C.	58,08	80,84	29,04	40,42	0,56	0,78	0,28	0,39
IV. Tag	2 Std.	12	20° C.	63,52	116,06	31,76	58,03	0,62	0,72	0,31	0,26
V. Tag	3 Std.	15	19° C.	68,91	156,96	23,97	52,32	0,72	0,87	0,24	0,29

Ammoniak-Bestimmung nach *Schlösing* in der Gesamt-Cultur mit Kalkmilch.

Rot:

Schale I 63,45
Schale II 61,71 i/S. 125,16 mgr NH_3
Davon als präexistierend subtrahiert: 11,90 mgr NH_3
Somit gebildet: 113,26 mgr NH_3

Weiss:

Schale I 54,92
Schale II 57,38 i/Sa. 112,30 mgr NH_3
subtrahiert: 11,90 mgr NH_3
Somit gebildet: 100,40 mgr. NH_3

IV. Versuch auf Reismehlnährboden. (Nach *Schneider.*)

Je neun Schalen. Oberfläche der Culturen ebenfalls cr. 3,2 qdcm.

Alter der Cultur	Zeitdauer des Versuchs	Litermenge d. durchgestrichenen Luft	Temperatur	Es wurden gebildet, berechnet in Milligramm: während d. ganz. Versuchs an CO_2		Also pro Std. an CO_2		während d. ganz. Versuchs an NH_3		Also pro Std. an NH_3	
				roter Stamm	weisser Stamm	roter Stamm	weisser Stamm	roter Stamm	weisser Stamm	roter Stamm	weisser Stamm
III. Tag	6½ Std.	20	22° C.	229,68	290,40	35,34	44,67	1,02	1,70	0,16	0,26
IV. Tag	3½ Std.	12	20° C.	137,28	195,36	39,22	55,82	1,36	2,38	0,39	0,68
V. Tag	3 Std.	10	20° C.	132,—	142,56	44,—	47,52	0,68	2,04	0,22	0,52

Ammoniak-Bestimmung nach *Schlösing* der Gesamtculturen mit Kalkmilch:

Rot:

Schale I 45,30
Schale II 44,62

i/Sa. 89,92 mgr NH_3
Davon als präexistierend subtrahiert: 9,86 mgr NH_3
Also gebildet: 80,06 mgr NH_3

Weiss:

Schale I 47,28
Schale II 48,54

i/S. 95,82 mgr NH_3
subtrahiert: 9,86 mgr NH_3
Also gebildet: 85,96 mgr NH_3

V. Versuch. Weisse und rote Culturen (derselben Fläche wie früher) auf Bouillon-Reis:

III. Tag	6 Std.	18	18° C.	116,16	195,36	19,36	32,56	1,36	2,04	0,22	0,34
IV. Tag	2½ Std.	7	19° C.	66,—	104,64	26,05	41,85	0,68	1,38	0,27	0,55
V. Tag	3 Std.	10	20° C.	71,48	110,88	23,82	36,96	Spuren	0,68	Spuren	0,24

Ammoniak-Bestimmung nach *Schlösing* der Gesamtculturen mit Kalkmilch:

Rot:

Schale I 56,78
Schale II 51,72

i/S. 108,50 mgr NH_3
Davon als präexistierend subtrahiert: 9,02 mgr NH_3
Also gebildet: 99,48 mgr NH_3

Weiss:

Schale I 48,62
Schale II 49,88

i S. 98,50 mgr NH_3
subtrahiert: 9,02 mgr NH^3
Also gebildet: 89,48 mgr NH_3

VI. Versuch auf Nährgelatine.

Je neun Petrischalen. (Oberfläche der Culturen wie früher.)

Alter der Cultur	Zeitdauer des Versuchs	Litermenge d. durchgestrichenen Luft	Temperatur	Es wurden gebildet, berechnet in Milligramm: Während d. ganz. Versuchs an CO_2 roter Stamm	Während d. ganz. Versuchs an CO_2 weisser Stamm	Also pro Std. an CO_2 roter Stamm	Also pro Std. an CO_2 weisser Stamm	Während d. ganz. Versuchs an NH_3 roter Stamm	Während d. ganz. Versuchs an NH_3 weisser Stamm	Also pro Std. an NH_3 roter Stamm	Also pro Std. an NH_3 weisser Stamm
III. Tag	6 Std.	20	19° C.	58,08	73,92	9,68	12,65	0,68	1,02	0,11	0,17
IV. Tag	8 Std.	26	20° C.	92,40	110,32	11,50	13,79	2,72	2,34	0,34	0,29
V. Tag	3 Std.	10	20° C.	39,60	52,80	13,20	17,60	0,68	0,44	0,22	0,15

Ammoniak-Bestimmung nach *Schlösing* der Gesamt-Culturen mit Kalkmilch vom 5.–10. Tage:

Rot:

Schale I 25,84
Schale II 25,50

i/S. 51,34 mgr NH_3
davon als präexistierend subtrahiert: 6,46 mgr NH_3
Also gebildet: 44,88 mgr NH_3

Weiss:

Schale I 28,58
Schale II 28,90

i S. 57,48 mgr NH_3
subtrahiert: 6,46 mgr NH_3
Also gebildet: 51,02 mgr NH_3

VII. Versuch auf Agar-Agar. Je neun Schalen. (Frühere Oberfläche.)

III. Tag	6 Std.	19	19° C.	39,60	58,08	6,60	9,68	2,76	1,06	0,46	0,18
IV. Tag	8 Std.	22	20° C.	42,24	63,36	5,28	7,92	3,06	1,70	0,38	0,21
V. Tag	3 Std.	12	20° C.	22,76	29,04	7,59	9,68	0,71	0,60	0,24	0,20

Ammoniak-Bestimmung nach *Schlösing* der Gesamt-Culturen mit Kalkmilch:

Rot:

Schale I 12,58
Schale II 13,26

i/S. 25,84 mgr NH_3
davon als präexistierend subtrahiert: 5,98 mgr NH_3
Also gebildet: 19,86 mgr NH_3

Weiss:

Schale I 13,94
Schale II 14,28

i/S. 28,22 mgr NH_3
subtrahiert: 5,98 mgr NH_3
Also gebildet: 22,34 mgr NH_3

Auf den folgenden Seiten sind die Hauptresultate und Folgerungen aus den umstehenden Tabellen kurz zusammengestellt.

Kohlensäure-Produktion am 3., 4. und 5. Tage.

Cultur	Tag	CO_2-Menge pro Stunde	Also pro Stunde im Durchschnitt des 3., 4. und 5 Tages	In 3 mal 24 Std. (am 3., 4. und 5. Tage)
Roter Stamm Kartoffel [1] (3. Versuch)	III.	29,04		
	IV.	31,76	28,25	2034,48 mgr
	V.	23,97		
Weiss. Stamm Kartoffel (3. Versuch)	III.	40,42		
	IV.	58,03	50,25	3618,48 mgr
	V.	52,32		
Roter Stamm Reismehl	III.	35,31		
	IV.	39,22	39,52	2845,44 mgr
	V.	44,—		
Weiss. Stamm Reismehl	III.	44,67		
	IV.	55,82	49,34	3552,24 mgr
	V.	47,52		
Roter Stamm Bouillon - Reis	III.	19,36		
	IV.	26,05	23,08	1661,52 mgr
	V.	23,82		
Weiss. Stamm Bouillon - Reis	III.	32,56		
	IV.	41,85	37,12	2672,88 mgr
	V.	36,96		
Roter Stamm Gelatine	III.	9,68		
	IV.	11,50	11,46	825,12 mgr
	V.	13,20		
Weiss. Stamm Gelatine	III.	12,65		
	IV.	13,79	14,66	1056,96 mgr
	V.	17,60		
Roter Stamm Agar-Agar	III.	6,60		
	IV.	5,28	6,35	467,28 mgr
	V.	7,59		
Weiss. Stamm Agar-Agar	III.	9,68		
	IV.	7,92	9,09	654,72 mgr
	V.	9,68		

[1]) Von den Versuchen mit Kartoffel-Nährboden habe ich den 1. und 2. auf pag. 28 in die Tabelle nicht aufgenommen, weil ich nur 2 Versuche auf jedem Nährboden bringen wollte. Ich will die Resultate jener hier aber kurz angeben:

		in 3 × 24 Std.	d. h. pro Std.
Roter Stamm auf Kart. gab in Vers.	I	2526,72	35,09 mgr CO_2
Weisser „ „ „ „ „ „	I	4214,40	58,53 „ „
Roter „ „ „ „ „ „	II	1944,00	27,00 „ „
Weisser „ „ „ „ „ „	II	3436,80	47,73 „ „

Ammoniaks-Produktion vom 3., 4. und 5. Tage

incl. der nach *Schlösing* gewonnenen Menge, wobei angenommen wurde, dass am 1. und 2. Tage zusammen ebensoviel NH_3 gebildet wurde, wie am 3. Tage.

Cultur	Tag	NH_3-Menge pro Std. an die Luft abgeg.	Also im Durchschnitt pro Std.	In 3 × 24 Std. an die Luft abgegeben	Nach *Schlösing*[1])	In Summa in 3 Tagen	Im Durchschnitt der 3 Tage gebildet
Roter Stamm Kartoffel (3. Versuch)	III.	0,28	0,28	19,92	84,92	104,84	1,45 mgr
	IV.	0,31					
	V.	0,24					
Weiss. Stamm Kartoffel (3. Versuch)	III.	0,39	0,35	24,96	75,30	100,26	1,37 mgr
	IV.	0,36					
	V.	0,29					
Roter Stamm Reismehl	III.	0,16	0,26	18,48	60,02	78,50	1,09 mgr
	IV.	0,39					
	V.	0,22					
Weiss. Stamm Reismehl	III.	0,26	0,49	35,04	64,47	99,51	1,38 mgr
	IV.	0,68					
	V.	0,52					
Roter Stamm Bouillon-Reis	III.	0,22	0,16	11,76	74,61	86,37	1,20 mgr
	IV.	—,—					
Weiss. Stamm Bouillon-Reis	III.	0,34	0,38	27,12	67,11	94,23	1,31 mgr
	IV.	0,55					
	V.	0,24					
Roter Stamm Gelatine	III.	0,11	0,22	16,08	33,66	49,74	0,68 mgr
	IV.	0,34					
	V.	0,22					
Weiss. Stamm Gelatine	III.	0,17	0,20	14,64	38,26	52,90	0,73 mgr
	IV.	0,29					
	V.	0,15					
Roter Stamm Agar-Agar	III.	0,46	0,36	25,92	14,89	40.81	0,56 mgr
	IV.	0,38					
	V.	0,24					
Weiss. Stamm Agar-Agar	III.	0,18	0,20	14,16	16,75	30,91	0,43 mgr
	IV.	0,21					

[1]) Es wurde also von der nach *Schlösing* in den Culturen ermittelten NH_3-Menge die Zahl für das präformierte Ammoniak abgezogen und von der Differenz $^3/_4$ genommen.

Zu den Stoffwechselversuchen ist zunächst zu bemerken, dass die dreifach angestellten Versuche mit Kartoffel-Nährböden (vergl. pag. 34) Resultate lieferten, welche zeigen, dass die Versuchsmethode recht befriedigend arbeitete. Es wurde erhalten pro Stunde im Durchschnitt der drei Versuchstage an Kohlensäure:

bei Versuch	I	II	III	
Vom roten Stamm	35	27	28	mgr
Vom weissen Stamm	58	48	50	„

Zahlen, die unter sich wohl so weit stimmen, als man dies bei derartigen Versuchen verlangen kann, bei denen weder eine absolut constante Temperatur, noch die Beimpfung einer absolut constanten Fläche durchzusetzen war.

Im übrigen lehren die Tabellen in Beziehung auf die Kohlensäure- und Ammoniak-Bildung, wenn wir von allen kleinen Differenzen absehen, Folgendes:

1. Entgegen unserer ursprünglichen Erwartung zeigte sich die Kohlensäure-Bildung der weissen Culturen um 20—50 % grösser und zwar auf allen Nährböden. Es ist also die Pigmentbildung bei dem Bacter. prodig. keineswegs gleichzeitig ein Zeichen einer besonders intensiven Fähigkeit zu chemischen Umsetzungen. Es entspricht dies der Beobachtung, dass nicht pathogene Stämme pathogener Arten manchmal zu gewissen chemischen Umsetzungen auf Nährböden und zu üppigerem Wachstum auf denselben befähigt sind.

2. Auf allen Nährböden werden erhebliche Mengen von Kohlensäure gebildet, und die Behauptung von *Scheurlen*, dass das Bact. prodig. nur scheinbar Kohlen-

säure bilde, indem es Kohlensäure aus Carbonaten freimacht, ist damit endgiltig widerlegt. Es ist in meinen Versuchen die Kohlensäure-Bildung sogar am schwächsten auf den kleine Mengen Carbonate enthaltenden Gelatine- und Agar-Nährböden (unsere Nährböden werden mit ziemlich carbonatarmer Natronlauge neutralisiert).

3. Die Bildung der Kohlensäure ist in ausgesprochenem Masse abhängig vom Gehalt der Nährböden an Stärke. Auf Kartoffel-, Reismehl- und Bouillon-reis-Nährböden wurden ziemlich ähnliche Kohlensäure-Mengen erhalten, die für die roten Stämme 23—35 mgr, für die weissen Stämme 37—58 mgr pro Stunde betrugen.

4. Interessant ist, dass auf Gelatine immer noch annähernd die doppelte Kohlensäuremenge gebildet wurde als auf Agar, obwohl das Bacterium auf Agar mit schöner Farbe und ziemlich üppig wächst. Es scheint der Agar, obwohl er ein Kohlehydrat darstellt, von dem Bact. prodig. nicht wie Stärke umgewandelt werden zu können. — —

5. Die Bildung von Ammoniak und substituierten Ammoniaken, die wir nicht auseinandergehalten haben, ist ausserordentlich viel geringer als die Kohlensäurebildung. Die gebildeten Kohlensäuremengen sind etwa 10—30 mal so gross als die Ammoniakmengen.

Vom Ammoniak geht nur $^1/_4$—$^1/_7$ der ganzen Menge in die Luft, die weitaus grössere Menge bleibt, zum Teil jedenfalls an Säuren gebunden, im Nährboden.

6. Die weissen und roten Stämme haben ungefähr gleiche Ammoniakmengen gebildet; im allgemeinen

sind aber die weissen Stämme auch in der Ammoniakbildung den roten etwas überlegen.

7. Auf den stärkehaltigen Nährböden beträgt die Ammoniakbildung pro Stunde 1—1,5 mgr, auf Agar und Gelatine 0,5 - 0,7 mgr. Es ist also die Ammoniakbildung durch die Anwesenheit reichlichen Kohlehydrats nicht nur nicht gestört, sondern sogar begünstigt worden. Man hätte auch erwarten können, dass bei einem lebhaften Verbrauch von Kohlehydraten der Stickstoff-Umsatz eingeschränkt gewesen wäre. Es scheint aber die Sache so zu liegen, dass überhaupt auf den stärkereichen Nährböden ein vermehrtes Wachstum stattfindet, und dass infolgedessen auch der Stickstoff-Stoffwechsel vermehrt ist.

Chemische Untersuchungen über das Pigment des Bacterium prodigiosum.

Erste Uebersicht über die chemischen Eigenschaften des Prodigiosum-Pigmentes.

Aus den Arbeiten meiner Vorgänger, die bei *Rosenberg* ausführlich notiert und besprochen sind, ergeben sich etwa folgende, leicht zu constatierende Grundeigenschaften des Prodigiosum-Farbstoffes, den ich im Folgenden nach Vorschlag von Herrn Professor *Lehmann* Prodigiosin nenne.

Prodigiosin wird getrockneten oder frischen abgeschabten Culturmassen durch Alkohol in roter Farbe entzogen. Die Nuance schwankt zwischen gelbrot und blaurot. Säurezusatz färbt blaurot, Alkalizusatz gelb. Beim Verdampfen des Alkohols hinterbleibt eine salbenweiche, karminrote Masse, welche in Aether bald mehr

gelbbraun, bald mehr rot löslich ist. Auch der Aether wird durch Alkalien gelb, durch Säuren rot gefärbt.

In Wasser ist das Prodigiosin so gut wie unlöslich, dagegen löst es sich in allen Lösungsmitteln für Fette, wie Benzol, Xylol, Petroleum-Aether, ätherischen Oelen, Terpentinöl, Schwefelkohlenstoff und Anilin, und zwar meist mit deutlich carminroter Farbe. Ziegelrote und blaurote Culturen verhalten sich gegen die Lösungsmittel nicht wesentlich verschieden. Immer wieder wird man überrascht durch das Auftreten unerwarteter, bald mehr blauroter, bald mehr gelber Farbennuancen, trotz Verwendung möglichst reiner, gleichmässiger Extraktionsmaterialien und ähnlich gewonnener Culturen.[1])

Gewinnung des Pigmentes zu weiteren Studien.

Im Anfang versuchten wir natürlich, die gelben und ausgesprochen roten Culturen getrennt zu bearbeiten in der Hoffnung, aus den einen ein gelbes und aus den anderen ein rotes Pigment zu erhalten. Doch blieben diese Bemühungen trotz aller Sorgfalt erfolglos und wir sahen bald ein, dass die Reaktion der Lösungsmittel, die Mengen des mit abgekratzten Nährbodens (Kartoffel etc.), der Wassergehalt unserer Lösungsmittel von weit grösserer Bedeutung für die Farbe der gewonnenen Lösungen seien, als die Farbe

[1]) Die provisorische Bezeichnung, Rubro-, Fulvo-, Luteo- und Purpureo-Prodigiosin, welche zur Vermehrung der Klarheit auf Rat von Herrn Professor *Lehmann* in der Rosenberg'schen Arbeit angewandt wurde, kann, nachdem unsere Kenntnis der Körper eine etwas gründlichere geworden ist, ohne Schaden wegbleiben.

der Culturen selbst. Und wir gingen deshalb sehr bald dazu über, gelbe und rote Culturen gleichmässig zur Farbstoffgewinnung zu verwenden.

In der Regel verfuhr ich dabei in der folgenden Weise. Ich brachte die frischen Culturen in einen grösseren Erlenmeyer-Kolben, übergoss sie mit 96 % Alkohol und führte das Pigment anfangs durch kräftiges Schütteln, am Ende auch durch Erwärmen auf dem Wasserbade zur völligen Lösung. Nach dem Erkalten wurde die dunkelrote Flüssigkeit von den mitgerissenen Nährbödenresten etc. durch Filtrieren getrennt und der Alkohol mittels Liebig'schen Kühlers abdestilliert, soweit, bis etwa $^5/_6$ des Alkohols übergegangen waren und die Lösung anfing sich zu trüben.

Der zurückgewonnene Alkohol konnte nun zum Auflösen neuen Pigmentes verwendet werden. Natürlich büsste er nach und nach an Lösekraft ein, wurde er doch durch Aufnahme von Wasser aus den Nährböden immer verdünnter. Mischte man eine mit frischem 96 % Alkohol bereitete völlig klare Lösung mit einer ebenfalls klaren Lösung, die aber mit durch Destillation zurückgewonnenem, verdünnten Alkohol hergestellt war, so trat eine mehr oder weniger starke Trübung ein, offenbar, weil jetzt schleimige Substanzen ausgefällt wurden.

Stammten die Culturen von Reisnährböden, so war der zurückdestillierte Alkohol auch deshalb nicht wiederholt zu gebrauchen, weil er nach und nach eine reichliche Menge Säure enthielt, so dass mit solchem statt einer roten eine blaurote alkoholische Lösung gewonnen wurde.

Damit sich das in der konzentrierten Flüssigkeit bereits ausgeschiedene Pigment nicht zu fest an den Wandungen des Glaskolbens festsetzte, wurde das Ganze noch heiss in eine Porzellanschale gegossen. Ich hatte jetzt eine etwas dickliche, tiefkirschrote Flüssigkeit vor mir, aus welcher sich etwas Pigment bereits in Form feiner, schwarzer Körnchen ausgeschieden hatte. Die Schale brachte ich alsdann auf ein Wasserbad und engte die Flüssigkeit weiter ein. Nach und nach schied sich nun der ganze Farbstoff teils in Form von auf dem Boden liegenden kleineren und grösseren Partikelchen aus, teils bildete das Pigment eine zusammenhängende, glänzende, schwarze Masse, die als dünne Haut obenauf schwamm. Die Flüssigkeit selbst trübte sich immer mehr, da sie immer alkoholärmer wurde. Durch Filtrieren wurde sodann das ausgefallene Pigment abgetrennt und auf dem Filter gut, aber bei mässiger Wärme getrocknet.

Es resultierte eine salbenartige, schwach glänzende, rotschwarze Masse, von eigentümlichen Geruch nach Honig und Blumen, welche nunmehr in Aether aufgelöst wurden.[1]) Die ätherische Lösung, welche sehr konzentriert war, wurde in kaltes, destilliertes Wasser in dünnem Strahle unter Umrühren eingegossen, wobei sich der Farbstoff als feine Klümpchen abschied und allmählich eine Schicht an der Oberfläche bildete; der Farbstoff ist offenbar leichter als Wasser. Mikroscopisch bestanden die so erhaltenen Massen stets aus amorphen Schollen, Krümeln oder Tröpfchen und

[1]) Ein kleiner Teil bleibt hierbei stets unlöslich zurück, auf welchen ich später noch zu sprechen komme.

Kügelchen von intensiv carminroter Farbe. Trotz mannigfacher Bemühungen haben wir niemals eine deutlich krystallinische Bildung erkennen können.

Das wie oben beschrieben ausgefällte Pigment wurde sodann auf ein Filter gebracht, mit dest. Wasser wiederholt und gut ausgewaschen und hierauf in wenig Alkohol gelöst, der Alkohol wie früher abdestilliert, das Pigment vorsichtig auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft und hierauf in möglichst wenig Aether gelöst. Der Aether wurde alsdann so rasch als möglich verdunstet, das restierende Pigment in ein gut schliessendes Glasgefäss gebracht, dieses noch mehrere Tage über Schwefelsäure getrocknet und nun vollständig vor Licht geschützt aufbewahrt.

Da die Behandlung mit Wasser in der Regel so gut wie keinen Einfluss auf das Verhalten des Pigmentes hatte, so habe ich die grosse Mehrzahl der späteren Untersuchungen mit einem Pigmente angestellt, was mit Alkohol gewonnen und mit Aether gereinigt war. Ich bin mir sehr wohl bewusst, dass dieses Prodigiosin höchstens den Namen Rohprodigiosin verdienen kann. Alle meine in Folgendem zu machenden Angaben beziehen sich auf dieses trockene Rohprodigiosin.

Die salbenartige Beschaffenheit des Farbstoffes legte den Gedanken nahe, dass derselbe etwas Fett enthalten konnte. Zur Entfernung desselben ist das Rohprodigiosin einmal in verdünntem, 65 % Alkohol gelöst worden, wobei Fett kaum in Lösung gehen konnte. Ich erhielt aber nach dem Verjagen des Alkohols das gleiche salbenartige Produkt.

Da Fett auch in schwach alkalischem Wasser in der Kälte kaum löslich ist, so verwandelten wir das Prodigiosin mit möglichst wenig Alkali und Wasser in eine gelbe, wasserlösliche Verbindung (vgl. spätere Kapitel). Aus derselben wurde der Farbstoff durch Säure ausgefällt und die Säure so vollständig wie möglich ausgewaschen. Das Produkt war alsdann in Aether löslich, aber immer noch nach dem Verjagen des Aethers salbenartig streichbar. Dieser Versuch wurde mehrfach wiederholt.

Als beste Reinigungsmethode von Fett musste uns der dritte von uns eingeschlagene Weg erscheinen. Wir überzeugten uns, dass das Prodigiosin in Eisessig zwar sehr löslich ist, dass aber Fett weder in kaltem Eisessig noch in kalter Auflösung von Prodigiosin in Eisessig auch nur spurenweis löslich ist. Ein Fettkörnchen schwimmt stundenlang ungelöst auf Eisessig. Verdampften wir eine Lösung von Prodigiosin in Eisessig, so erhielten wir wieder ein salbenartiges Pigment.

Die Lösung in Eisessig ist alsdann in einen Pergamentpapierschlauch gegen destilliertes Wasser unter häufigem Erneuern desselben dreimal 24 Stunden dialysiert worden. Es schied sich im Schlauch eine rote, flockig-krümelige Masse ab, die aber wieder streichbar war und unter dem Mikroscop keine Spur von Krystallisation erkennen liess.

Da alle diese Reinigungsmethoden keine nennenswerte Wirkung hatten, so wurden sie später in der Regel weggelassen.

Ausbeute, Färbekraft und Haltbarkeit des Prodigiosins.

Ich will hier eine orientierende Angabe über die Ausbeute an Pigment aus den abgeschabten Culturen machen. Völlig trockene, dunkelrot gefärbte Culturen wurden wiederholt im Mörser mit kaltem und warmem Alkohol verrieben, bis weiterer Alkohol farblos blieb, sodass also alles Pigment in Lösung gegangen war. Die verschiedenen Auszüge wurden alsdann vereinigt, der Alkohol vorsichtig verdampft und das erhaltene Pigment bei 100° getrocknet und später gewogen. Ich erhielt von 2,6 gr trockenen Culturen 0,028 gr trockenes Roh-Pigment; also war die Ausbeute gleich 1,08 %.

Um die Färbekraft des Prodigiosins mit derjenigen eines bekannten roten Farbstoffes zu vergleichen, stellte ich mir eine Fuchsinlösung von 1 gr pro 1 Liter dest. Wassers her, also eine $^1/_{00}$ Lösung. Dieselbe wurde hierauf so lange verdünnt, bis sie mit einer vorhandenen 0,25 % roten, alkoholischen Prodigiosin-Lösung in ihrer Farbenstärke ungefähr übereinstimmte. Das Endresultat war, dass eine 0,05 $^0/_{00}$ Fuchsinlösung mit einer 0,25 % Prodigiosinlösung übereinstimmte; mithin war die Färbekraft des Fuchsins 50 mal stärker als diejenige des Prodigiosins.

Die Haltbarkeit des trockenen Pigmentes von salbenartiger Konsistenz ist eine grosse. Namentlich schien mir eine ganz schwach saure Reaktion des Pigments, resultierend aus der Verwendung von Säure bei der Herstellung, vorteilhaft für die Haltbarkeit. Ich darf anführen, dass Herr Professor *Lehmann* sehr schlechte Erfahrung mit der Aufbewahrung von Pig-

ment, das er mit Kreide verrieben hatte, gemacht hat. Er war damals von der Ansicht ausgegangen, dass eine möglichst neutrale Reaktion für die Haltbarkeit von Wert sei.

Bessere Resultate hat Herr Professor *Lehmann* gehabt, als er einfach dadurch den Farbstoff aufbewahrte, dass er Culturen auf Papier aufstrich und das Papier trocknete. Jedenfalls geht aber aus unserem Studium hervor, dass die Aufbewahrung des trockenen Pigmentes ohne oder besser mit einer Spur Säure am zweckmässigsten ist.

Ueber die Haltbarkeit der Lösungen will ich schon an dieser Stelle einige Worte sagen. Sehr konzentrierte alkoholische und ätherische Lösungen halten sich in geschwärzten oder gelben Gläsern recht gut. Nach zehn Monaten fand ich eine ätherische Lösung nur wenig verblasst. Auch hier ist ein schwacher Säuregehalt empfehlenswert.

Das Pigment und seine Lösungen sind sehr lichtempfindlich, wie folgende Versuche beweisen:

Ich liess einige Tropfen einer alkoholischen Farbstofflösung auf Filtrierpapier verdunsten und erhielt einen tiefroten Flecken. Das Papier wurde in zwei Teile geteilt, und während ich die eine Hälfte an einer Fensterscheibe des Arbeitssaales befestigte, legte ich die andere in ein Buch. Schon am anderen Tage war das dem Tageslichte, zeitweilig auch dem direkten Sonnenlichte ausgesetzte rote Papier vollkommen entfärbt, während das in das Buch eingelegte sich auch noch nach vielen Monaten völlig unverändert erwies.

Es war hierdurch auch gleich bewiesen, dass der Farbstoff keine praktische Verwendung finden kann, etwa zum Färben von Wolle und Seide, die sich sehr hübsch mit einer roten, alkoholischen Prodigiosinlösung färben lassen, aber im Tageslicht sehr bald wieder verblassen.

Zur Prüfung der Lichtempfindlichkeit der Lösungen habe ich verschiedene Versuche angestellt. So brachte ich z. B. eine braungelbe (madeirafarbene) ätherische und eine carminrote alkoholische Lösung in je ein Reagensglas und hing beide an einem Südfenster auf, sodass sie also nicht nur dem Tageslichte, sondern zeitweise auch (der Versuch wurde im Monat Dezember ausgeführt) dem direkten Sonnenlichte ausgesetzt waren. Dabei machte ich folgende Beobachtungen. Am 1. und 2. Tage konnte ich an den belichteten Proben eine Farbenveränderung nicht constatieren. Vom 3. Tage ab begannen sie, namentlich die ätherische Lösung, heller zu werden. Am 8. Tage hatte letztere eine Rheinweinfarbe, während die tief carminrote Farbe der anderen um etwa 50 % an Stärke eingebüsst hatte. Am 16. Tage war die ätherische Lösung strohgelb, von da ab behielt sie diese Nuance bei, eine völlige Entfärbung trat also nicht ein. Die alkoholische Lösung war ebenfalls noch etwas heller geworden, ohne jedoch ihre ganze Farbe einzubüssen.

Untersuchungen über den Unterschied der Färbung der gelben und roten Culturen und ihrer alkoholischen Auszüge.

Schon *Rosenberg* hat mit Herrn Professor *Lehmann* die Frage studiert, woher die verschiedene Farbe der

gelben und roten Culturen komme. Das Resultat dieser Versuche war, wie schon eingangs erwähnt wurde, dass nicht etwa die roten Culturen sauer und die orangegelben Culturen alkalisch waren, sondern dass alle geprüften Culturen auf der Kartoffel immer eine deutliche, alkalische Reaktion zeigten, sie mochten gelb, orange, ziegelrot oder blaurot sein.

Wir können diese Angaben auf Grund vielfacher neuer, mannigfach modificierter Prüfungen unter Verwendung von Phenolphtalein und Lackmuspapier durchaus bestätigen. Die Ammoniak- (resp. Methylamin-) Menge in den Culturschalen ist immer so gross, dass hineingelegte Lackmusstreifchen blau, Phenolphtaleinpapierchen carminrot verfärbt wurden, nicht immer mit gleicher Intensität, aber niemals fehlte die Verfärbung. Soweit man dies mit Reagentien bestimmen kann, erschien auch uns die alkalische Reaktion der gelben Culturen stärker als die der roten. Wurden gelbe Culturen abgeschabt, so wurden sie beim leichten Trocknen sofort rot, in Wasser suspendiert, ebenfalls sofort carmoisinrot.

Zum Zwecke des Spectroscopierens zwischen Glasplatten ausgestrichen, ändert sich ebenfalls die Farbe so rasch von Gelb in Rot, dass nur sehr gewandtes Arbeiten das Spectrum der gelben Culturen zu beobachten gestattete. Umgekehrt werden die roten Culturen, wie eingangs ebenfalls hervorgehoben, beim Annähern an eine Ammoniakflasche sofort gelb. Es genügt aber auch leichtes Erwärmen, ja nur Bewegen in der Luft, um die rote Farbe zurückkehren zu lassen.

Es führen uns also Beobachtungen und Versuche allesamt zu der Ansicht, die gelben Culturen verdanken ihre gelbe Farbe einem stärkeren Alkaligehalte; die roten Culturen sind schwach alkalisch.[1])

Man könnte schliessen, dass die Alkaliproduktion des Organismus nach Rasse, Kartoffelart und Alter der Cultur in nicht unerheblichem Umfange schwankt. Man muss aber auch bedenken, wie geringe Alkalimengen nur notwendig sind, um bei Anwesenheit geringer Flüssigkeitsmengen rote Culturen gelb zu färben. Die Ammoniakbildung ist, wie aus meinen Stoffwechselversuchen hervorgeht, in den ersten Tagen in der Regel etwas stärker als in den späteren. Auffallend ist auch, dass wenn sich an den Kartoffelscheiben an unabsichtlich schwachgeimpften oder durch Condenswasser nachträglich infizierten Stellen später langsam Culturen entwickelten, diese regelmässig gelb gefärbt sind.

Man könnte nun erwarten, aus den roten und gelben Culturen mit dem gleichen Lösungsmittel verschieden gefärbte Lösungen zu gewinnen. Die minimal saure Reaktion[2]) des gewöhnlich verwendeten Alkohols

---

[1]) Auf älteren Milchreis-Culturen trat einige Male deutlich saure Reaktion ein und eine Verfärbung der Cultur ins Intensiv-Blaurote, wie man sie durch Säurewirkung aus den mehr carminroten schwachalkalischen Culturen erzeugen kann.

[2]) Die Prüfung der sauern Reaktion des Alkohols wurde mit unserem Lackmus nur unsicher nachgewiesen. Dagegen entfärbte der Alkohol ausserordentlich deutlich durch Alkalispuren violett gemachte Phenolphtalein-Lösungen, oder mit geringer Alkalimenge gelbgefärbte

reichte aber hin, um die Alkalescenz der gelben Cultur so weit abzustumpfen, dass rote Lösungen erhalten wurden. Ausserdem erteilt schon Wasserzusatz der gelben Culturmasse eine rote Farbe. Arbeitet man allerdings mit möglichst reinen Reagentien, so kann man Unterschiede geringfügiger Art an den Lösungen der roten und gelben Culturmassen beobachten. In absolutem, säurefreien Alkohol erhält man aus frischen roten Culturen einen gelbroten bis granatroten, aus orangegelben Culturen einen mehr gelben Auszug, entsprechend dem grösseren Alkaligehalte der gelben Rassen. Trocknet man aber die Culturen, wobei beide rotgefärbte Massen bilden, so liefern beide gelbrote Auszüge. Offenbar ist beim Trocknen etwas flüchtiges Alkali entwichen.

In dem gewöhnlichen 96 % käuflichen Alkohol erhält man häufig infolge seines geringen Säuregehaltes kräftig-carmin- bis blaurote Auszüge, selbst aus gelbem Culturmaterial, wenn man nur wenig Cultur und viel Alkohol verwendet.

Dass wir bei der Pigmentherstellung im Grossen meist granatrote oder gelblichrote, selten carminrote Auszüge erhalten haben, erklärt sich, dass stets etwas Culturmasse beim Abschaben mitgenommen wurde. Stücke der vom Pilz bewachsenen, alten Kartoffelscheiben reagieren intensiv alkalisch. Ein kleines Stück reicht hin, um eine durch sauren Alkohol gerötete carminrote Lösung in eine solche von gelbbrauner Farbe überzuführen. Es hängt also die Farbe der

Luteol-Lösungen. Ebenso verwandelte er die rote Färbung einer sehr schwach alkalischen Rosolsäurelösung prompt in gelb.

alkoholischen Lösungen bei der Pigmentherstellung in erster Linie nicht von der Farbe der Cultur, sondern von der Reaktion des Alkohols und der Quantität der mit abgekratzten Kartoffelstückchen ab.

Genaue Untersuchung über das Verhalten des Pigmentes in alkoholischer Lösung.

Neutrale Prodigiosinlösungen in absolutem Alkohol zeigen eine zwischen gelb und rot in der Mitte stehende Färbung, die wir mit feuerfarben, rotgolden, in anderen Fällen mit granatrot richtig zu bezeichnen glaubten. Eine ganz exakte Angabe lässt sich nicht machen, weil Alkalispuren, die auf andere Indikatoren kaum reagieren, den Farbenton aus rotgelb in braungelb und aus braungelb in zeisiggelb verwandeln, während umgekehrt sehr kleine Säuremengen die Feuerfarbe der Lösungen rasch in blaurot überführen. Dabei bleibt das Pigment stets gut in Alkohol löslich. Auch Kohlensäure bringt — im Gegensatz zur ätherischen Lösung — die Blaurotfärbung augenblicklich hervor.

Sehr merkwürdig ist die Thatsache, dass Wasser eine alkoholische, gelbrote Prodigiosinlösung in auffallender Weise carminrot färbt, auch wenn nur 10 bis 20 % Wasser zugesetzt wurden und das Wasser absolut sicher nicht sauer war. Ja, es gelingt sogar, alkoholische Lösungen, die man zuerst gelb mit Alkali färbte, durch reines Wasser carminrot zu machen. Sogar deutlich alkalisches Wasser bringt diese carminrote Färbung hervor. Gleichgiltig war es, ob das Wasser mit Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat oder Aetznatron

alkalisch gemacht worden war. Die scheinbare Säurewirkung des Wassers lässt sich sogar titrimetrisch verfolgen, wie folgendes Beispiel ergibt. Cr. 10 ccm gelbroter Alkohol wird durch wenig Wasser carminrot gemacht. 2 Tropfen $^1/_{10}$ N. Natronlauge färben wieder gelb, 4 ccm Wasser wieder rot, 2 Tropfen $^1/_{10}$ N. Natronlauge stellen die gelbe Farbe wieder her, die durch einige ccm Wasser nochmals in rot verwandelt wird.

Gerade wie Wasser wirken wässerige Lösungen von Kochsalz, Chlorlithium, Jodkalium, Rhodanammonium etc., alle färben die gelbrote, alkoholische Lösung rot.

Ist diese Carminrotfärbung durch Zusatz bescheidener Wassermengen hervorgebracht, so lässt sie sich durch Erwärmen vorübergehend wieder mit einer gelbroten Farbe vertauschen. Es wirkt also das Wasser gegen eine neutrale, alkoholische Lösung wie eine Säure, und die Wärme hebt die Wasserwirkung wieder auf. Beim Abkühlen stellt sich die rote Farbe wieder her. Ist dagegen eine alkoholische Prodigiosinlösung durch viel Wasser rot gefärbt, so hat das Erwärmen nur einen ganz geringen Einfluss. Setzt man dagegen zu der heissen, verdünnten, rot-alkoholischen Lösung nun nachträglich wieder Alkohol, sodass die Wasserconcentration wieder heruntergedrückt wird, so färbt sich sofort die Lösung gelber und rötet sich erst wieder beim Abkühlen.

Es schien von Interesse, zu sehen, ob feste Salze eine durch Wasser gerötete, alkoholische

Lösung gelb zu färben vermöchten. Der Versuch mislang mit Natrium- und Magnesiumsulfat und Chlornatrium; die Farbe wurde gar nicht beeinflusst. Ebenso wenig wurde eine wasserfreie feuerfarbene Lösung durch die Reagentien beeinflusst. – Verwendet man Chlorcalcium, um einer alkoholischen Lösung das Wasser zu entziehen, so tritt stets eine Färbung gegen gelb hin ein und zwar um so rascher, je wasserreicher der Alkohol ist. Es ist das nicht wunderbar, da das geschmolzene Chlorcalcium immer kleine Mengen von Aetzkalk enthält und Aetzkalk als Alkali wirkt. Aetzkalk selbst und Baryumhydroxyd wirken genau wie Chlorcalcium.

In möglichst wasserfreiem Alkohol (derselbe wurde zweimal über Chlorcalcium destilliert) ist die Wirkung eines Aetzkalk enthaltenden Chlorcalciumbrockens ausserordentlich schwach. Durch Lackmuspapier kann man sich überzeugen, dass auch absoluter Alkohol langsam kleine Mengen Alkali aus geglühtem Chlorcalcium aufnimmt.

Am Schluss dieses Kapitels möchte ich noch anführen, dass ich über die Säure- und Alkaliwirkung auf alkoholische Prodigiosinlösungen gefunden habe, dass 10 ccm einer etwa neutralen $^1/_{16}$ %igen, d. h. tiefgranatroten Lösung durch Hinzufügen von 1 ccm einer $^1/_{100}$ N. Natronlauge deutlich gelb gefärbt wurde. Um die Carminfärbung auf diese granatrote Lösung deutlich erkennen zu können, mussten etwa 3 ccm einer $^1/_{100}$ N. Säure auf 10 ccm Lösung hinzugefügt werden.

Verhalten des Prodigiosins in ätherischer Lösung.

Aetherische Prodigiosinlösungen lassen sich sehr leicht gewinnen durch Uebergiessen des trockenen Prodigiosins mit Aether. Aber auch aus den getrockneten Culturen lassen sich leicht erhebliche Mengen Farbstoff direkt mit Aether ausziehen, wenn man die Culturmasse mit Quarzsand und einem Pistill sorgfältig verreibt.[1]) Die so gewonnenen, ätherischen Lösungen sind orangegelb, bei stärkerer Concentration braungelb bis dunkelbraun. Durch besondere Versuche überzeugten wir uns, dass die gelben bis braunen Töne der ätherischen Lösung nicht etwa von einem Alkaligehalte des Aethers herrührten. Wir haben mehrfach Aether längere Zeit mit Schwefelsäure geschüttelt und constatiert, dass dies ohne Einfluss auf die damit hergestellten Lösungen blieb.

Die gelbe bis gelbbraune ätherische Lösung des Pigmentes wird in Menge von 10—20 ccm durch sehr geringe Säuremengen, z. B. durch ein wenig Salzsäure-

[1]) Hat man 3—4 mal extrahiert, so nimmt der Aether keine nennenswerte Farbstoffmenge mehr auf, es gehen jetzt aber, wie ich mich wiederholt überzeugen konnte, in Alkohol noch erhebliche Farbstoffmengen, etwa 30 %, über. Nach mehrmaligem Auszuge mit Alkohol geht zuletzt noch etwas schmutzig-rot-bräunliches Pigment (wohl ein Zersetzungsprodukt) an Wasser über, was ich nicht näher studiert habe. Der alkoholische und ätherische Auszug gibt beim Verdunsten das gleiche Produkt, wenn nur reine Extractionsmittel verwendet wurden. Eine sichere Erklärung, warum nicht der ganze Farbstoff mit Aether auszuziehen ist, vermag ich nicht zu geben; wir vermuten, dass das Pigment zum Teil von Stoffen eingeschlossen ist, welche für Aether undurchdringlich sind.

dampf, durch einen Tropfen $^1/_{10}$ Normal-Schwefelsäure sofort carminrot gefärbt. Alkalien bringen erst eine rotgelbe, dann eine braungelbe und schliesslich eine citronengelbe Farbe hervor. Interessant und von uns unzählige Male festgestellt ist, dass eine braungelbe, ätherische Lösung bei leichtem Schütteln mit Wasser stets eine hellere, mehr citronengelbe Farbe annimmt, genau so, als ob das Wasser Alkali enthalten hätte, oder als ob Spuren von Säuren durch das Wasser enfernt worden seien.

Das Schütteln der gelbbraunen ätherischen Lösung mit reinem Wasser kann man so lange und so intensiv fortsetzen, wie man will, ohne dass die anfangs eingetretene citronengelbe Verfärbung des Aethers sich noch einmal verändert, ganz im Gegensatz zum Verhalten der alkoholischen Lösungen, die ja mit Wasser sofort rot werden. Dass die braungelbe, ätherische Lösung höchstwahrscheinlich sehr geringe Säurespuren enthält, ist nicht zu verwundern, wenn man bedenkt, dass unser käuflicher Aether, wie er im Laboratorium verwendet wird, stets kleine Säuremengen mit sich führt, die wir mit kleinen Phenolphtaleinmengen wiederholt nachgewiesen haben.[1])

[1]) Uebrigens will ich hier einschalten, dass durch Einleiten von gereinigter Kohlensäure in gelbe ätherische Lösungen sich stets auch bei Anwesenheit von Wasser nur eine leichte Verfärbung gegen rötlich oder bräunlich erreichen lässt, die beim Schütteln mit destilliertem Wasser wieder verschwindet.

Andere Male beobachteten wir, dass ein ebenfalls gelbbraun gefärbter Aether sich mit reinstem destillierten Wasser beim Schütteln rot färbte, und zwar trat dabei bald mehr eine Rotfärbung des Aethers auf, während das Wasser farblos blieb, bald färbte sich umgekehrt das Wasser stärker und der Aether schwächer rot. Es stellte sich heraus, dass wir die Rotfärbung mit Wasser jedesmal bekamen, wenn die gelbbraune ätherische Lösung nicht direkt gelbbraun aus den Culturen gewonnen, sondern wenn sie erst nachträglich aus einer durch Säure geröteten ätherischen Lösung durch Alkalizusatz hergestellt worden war. Weiter unten ist auseinandergesetzt, dass durch geduldiges Schütteln selbst mit sehr verdünntem Alkali Prodigiosin in das ätherrötende Paraprodigiosin übergeht.

Ein Versuch, eine gelbe ätherische Lösung durch Chlorcalcium zu trocknen, ergab das wunderbare Resultat, dass sich die Lösung intensiv carminrot färbte. Die Versuche wurden mannigfach modificiert, das Chlorcalcium in kohlensäurefreiem Luftstrom geglüht, stets erhielten wir die rote Farbe. In gleicher Weise färben aber auch festes Baryumchlorid und Chlornatrium den Aether rot. Alle diese Reaktionen scheinen aber nur einzutreten, wenn der Aether Spuren von Wasser enthält. Bei Verwendung von absolut trockenem Aether konnte nach mehreren Tagen keine Veränderung der Farbe beobachtet werden. Setzt man aber absichtlich etwas Wasser hinzu, so verhält sich das geglühte, Aetzkalk enthaltende Chorcalcium verschieden von den übrigen

Chloriden. Es färbt seiner alkalischen Beschaffenheit entsprechend (p. 59, 60), den Aether gelb, währenddem reines krystallinisches Chlorcalcium, Chlorbaryum und Chlornatrium den Aether bei Anwesenheit von viel und wenig Wasser rot färben. Magnesiumsulfat wirkt weder trocken noch mit wenig oder viel Wasser auf eine gelbe ätherische Lösung ein.

Diese Versuche auf andere Gruppen von Salzen auszudehnen, habe ich unterlassen, jedenfalls steht soviel fest, dass die Chloride, auch wenn sie gegen Lackmus völlig indifferent sind, auf Aether rötend einwirken, sowie etwas Wasser zugegen ist, währenddem reines Wasser die gelbe ätherische Lösung nicht angreift.[1])

Verhalten des Prodigiosins gegen Wasser und verdünnte Säuren.

Behandelt man festes Prodigiosin lange Zeit geduldig mit Wasser, so gelingt es meist, demselben eine ausserordentlich schwach rosarote Farbe zu erteilen, doch ist uns dieser Versuch nicht immer gelungen. Prodigiosin darf also in reinem Wasser als so gut wie unlöslich bezeichnet werden. Einige meiner Vorarbeiter haben eine Lösung zu erzielen geglaubt. Während *Scheurlen* zuerst ebenfalls für die Unlöslichkeit spricht, glaubt er später, mit sehr viel kaltem Wasser etwas Pigment in Lösung bekommen zu haben. *Eisenberg* schreibt: „Das Pigment löst sich in Wasser, Alkohol und Aether". Das klingt also, als ob es in allen drei

[1]) Dass das saure Sublimat den Aether rötet, ist natürlich ohne besonderes Interesse.

Lösungsmitteln gleich gut löslich sei. Ebenso bemerkt *Laurant* in seiner ‚Etude sur la variabilité du Bacille rouge de Kiel': „Soluble dans de l'eau" und *Bordoni Uffreduzzi* schreibt endlich: „Löst sich sehr gut in Wasser". Wenn man zu dem Versuche frische, von Kartoffel oder Reis abgeschabte Culturmassen im Mörser mit Wasser gut verrieb, so gewann es allerdings für den ersten Augenblick den Anschein, als ob man eine vollständige Lösung vor sich habe. Selbst nach wiederholtem Filtrieren und zwar durch bestes Filtrierpapier glaubte man, dass es sich noch um eine Lösung handelte. In ein Reagensglas gebracht und zur Seite gestellt, bemerkte man erst am 5. Tage die Bildung einer helleren Zone von der Oberfläche der Flüssigkeit aus, und erst am 15. Tage hatte sich das ganze Pigment niedergeschlagen, und die überstehende Flüssigkeit war vollständig farblos. Derselbe Versuch mit sehr viel H_2O ergab genau das gleiche Resultat. Die sog. Lösung einzelner Autoren war also nichts als eine feine Suspension des Farbstoffes in Wasser. Natürlich wurde auch durch Erwärmen resp. Kochen dieser wässerigen Suspension eine Lösung versucht, aber ebenfalls mit völlig negativem Resultate. Ebenso war das Resultat, wenn man versuchte, das durch Eindampfen einer alkoholischen oder durch Verdunsten einer ätherischen Lösung gewonnene Pigment in Wasser zu lösen. — — — Versetzt man dagegen Wasser mit sehr geringen Mengen Salzsäure oder Schwefelsäure, so lässt sich ohne Schwierigkeit eine schön rosafarbene Lösung herstellen. Grössere Prodigiosinmengen kann man auf diese Weise nicht in Lösung bringen.

In starken Mineralsäuren ist die Löslichkeit viel schwächer als in verdünnten Säuren, dagegen löst sich das Pigment leicht in Eisessig.

Löst man das Pigment in Alkohol, so wird es durch alle Säuren gerötet, auch durch Kohlensäure; letztere wirkt um so schwächer, je wasserfreier der Alkohol und je trockener die Kohlensäure ist. Wir sahen oben, dass schon Wasser allein auf die gelbrote alkoholische Lösung wie Säure wirkt.

Interessant ist, dass schwefelige Säure auch bei langem, mehrstündigem Einleiten eine alkoholische Lösung, die sofort carminrot wird, nicht vollständig entfärbt, während, wie wir noch sehen werden, Chlor den Farbstoff sofort entfärbt.

In ätherischer Lösung wird, wie wir gesehen haben, der Farbstoff durch jede Säurespur rot gefärbt, nur Kohlensäure wirkt nicht weiter als wie bis zu einer bräunlichen oder blassbräunlichen Nuance. Interessant ist es, eine gelbe ätherische Lösung auf Wasser geschichtet im Reagensglase mit succesiv grösseren Säuremengen zu behandeln. Man kann hier regelmässig folgende vier Stadien unterscheiden.

1. Phase. Durch Zusatz des ersten Tropfens $^1/_{10}$ N. Säure rötet sich der Aether; die Farbe verschwindet sodann beim Umschütteln vollständig, der Aether wird wieder gelb, das Wasser farblos. (Diese Phase ist mit Schwefelsäure, Salzsäure, Bernsteinsäure, ja selbst mit Oelsäure — hier nur andeutungsweise — erhalten worden.)

2. Phase. Bei weiterem vorsichtigen Säurezusatz färbt sich der Aether immer wieder vorübergehend

carminrot, durch Schütteln mit Wasser geht die Farbe in gelbbraun bis rotgelb über, während das Wasser allmählich eine carminrote Farbe zeigt, die sich nicht allzu sehr verstärken lässt.

Es ist offenbar das Prodigiosin in schwach angesäuertem Wasser etwas löslich, wie eingangs schon bemerkt wurde.

3. Phase. Bei weiterem Säurezusatz wird der Aether rot, und das Wasser bleibt noch rot.

4. Phase. Nach etwas stärkerem Säurezusatz verliert der Farbstoff seine Löslichkeit auf einmal in Wasser und geht nun völlig in Aether über, der schön carminrot gefärbt ist. Hebt man den Aether ab und schüttelt ihn dreimal mit reinem Wasser, so wird er gelb.

Wir haben diesen Versuch meist mit Schwefelsäure durchgeführt. Besonders häufig kann man die erste Phase des Versuchs beobachten. Stets wenn man eine schwachsaure, gerötete ätherische Lösung mit Wasser schüttelt, stellt sich die gelbe oder mindestens gelbbraune Farbe des Aethers wieder her, weil das Wasser dem Aether die Säure leicht entzieht.

Ueber die Wirkung starker Säuren und des Chlors auf das Pigment.

Starke Mineralsäuren zeigen keine intensive Reaktion mit dem Farbstoff. Sie färben ihn rot, und rot-violett und zerstören ihn allmählich, wobei sich gelbliche, resp. blassrötliche Lösungen bilden. Konzentrierte Schwefelsäure färbt gelbbraun, d. h. sie zerstört den Farbstoff. Chlorspuren vermögen sowohl in ätherischer wie alkoholischer Lösung den Farbstoff leicht zu zerstören.

Nicht selten ist es uns bei unseren Versuchen aufgefallen (auch *Rosenberg* berichtet schon hierüber), dass bei der Einwirkung namentlich von starken Säuren auf Prodigiosinlösungen dann und wann ein mehr violetter Körper auftrat. Wir haben nun diesen violetten Körper in folgender Weise zu isolieren versucht. Wir erwärmten eine gelbe Prodigiosinlösung in starker Natronlauge so lange, bis sie rot geworden war und versetzten sie alsdann mit konzentrierter Salzsäure. Es entstand sofort eine prachtvolle violette Lösung. Dieselbe wurde mit Aether versetzt und liess nun zwei Bestandteile erkennen: a) einen in Aether rot löslichen Körper, der sich als gewöhnliches Prodigiosin erwies und b) einen schön blauvioletten Körper, der an der Grenze von Aether und Wasser sich fest ausschied. Mittels Scheidetrichter wurde dieser Körper auf ein Filter gebracht. Beim Waschen mit Alkohol gab er an diesen eine rötliche Farbe ab, die auch wieder nichts anderes als gewöhnliches Prodigiosin zu sein schien. Eine richtig violette Lösung konnten wir weder mit Alkohol, Aether oder Wasser, noch mit den gleichen Medien nach dem Ansäuren erhalten. In Natronlauge löste sich die violette Masse mit schmutzig-gelber Farbe. Unter dem Mikroscop bestand sie aus faltigen Häutchen. Eine weitere Untersuchung erfolgte nicht.

Verhalten des Prodigiosins gegen Alkalien in wässeriger, alkoholisch. und ätherisch. Lösung.

I. In wässeriger Lösung.

Bringt man zu trockenem Prodigiosin kleine Mengen $^1/_{10}$ N. Natronlauge, so löst sich dasselbe mit

gelbroter bis braungelber Farbe auf. Zusatz geringer Wassermengen bringt, so lange kein grosser Natronlaugenüberschuss vorhanden ist, fast sofort eine Rotfärbung der Flüssigkeit hervor. Es verändert also Wasser die gelbbraune Alkali-Prodigiosin-Verbindung ganz ähnlich, wie es die gelbe oder gelbrote alkoholische Lösung umwandelt. Zu der durch Wasser gerötеten, wässerig-alkalischen Lösung muss man recht erhebliche Mengen von Natronlauge setzen, um die gelbbraune Farbe wiederherzustellen, oder es ist mit einem Wort die gelbbraune Alkali-Prodigiosin-Verbindung nur beständig bei Anwesenheit erheblicher Concentrationen freien Alkalis.

Die Umwandlung einer gelbalkalischen in eine rotalkalische wässerige Lösung wird begünstigt durch Anwendung von Wärme, wie folgender Versuch beweist: Eine gelbalkalische Lösung wurde in der Porzellanschale erwärmt, worauf der Farbenton von gelborange in rot mit einem schwachen Stich in blau überging. Der Umschlag ging sehr rasch vor sich, und die Flüssigkeit war bereits völlig rot, noch lange bevor alles Ammoniak vertrieben war, denn ich überzeugte mich hiervon durch die noch starke Bläuung von darübergehaltenem roten Reagenspapier, ferner durch den noch sehr deutlichen Ammoniakgeruch. Wir hatten also in diesem Falle eine rote, alkalische Lösung.

Im übrigen ging der Farbenwechsel, da er eine einfache Ammoniakabdunstung als Veranlassung hatte, auch ohne Anwendung von Wärme vor sich. Ich liess die Flüssigkeit längere Zeit in offener Schale stehen

und konnte schon am zweiten Tage dasselbe Resultat verzeichnen.

Der beschriebene Versuch lässt sich in gleicher Weise mit Natronlauge wie mit Ammoniak durchführen. Die entstehende rote Flüssigkeit hat stets einen mehr oder weniger blauroten Stich. Oft ist sie ganz klar, anderemale, namentlich wenn konzentrierte Lösungen angewandt worden sind, ist sie deutlich trüb, und es scheidet sich, besonders beim Stehen, ein rotes Pulver ab, welches, abfiltriert und getrocknet, in Aether wie in Wasser löslich ist.

Einmal war das abgeschiedene Pulver gar nichts anderes als Prodigiosin, das sich in Aether mit gelber Farbe, ebenso in Alkali und Wasser gelb löste. Andere Male aber war die ätherische Lösung rot, trotz der alkalischen Reaktion. Wir wollen diesen, bei alkalischer Reaktion in Aether rot löslichen Körper einstweilen Paraprodigiosin nennen. Er unterscheidet sich vom Prodigiosin dadurch, dass er sich in Aether rot löst, mit beliebigen Alkalimengen in wässeriger Lösung versetzt, nie gelb wird, dass er durch Säure seine Farbe nicht verändert, dass er überhaupt gegen Säure und Alkalien gleich indifferent scheint.

Zur Bildung dieses Paraprodigiosin scheint es namentlich dann zu kommen, wenn ein starker Alkaliüberschuss zur Herstellung der alkalischen Prodigiosinlösung verwendet wurde, doch entsteht es, wie weiter unten auseinandergesetzt ist, auch schon bei Einwirkung verdünnten Alkalis auf Prodigiosin. Die Rück-

verwandlung des Paraprodigiosins in gewöhnliches Prodigiosin gelang meist leicht dadurch, dass man Paraprodigiosin in Aether löste, mit überschüssiger Säure behandelte und dann vorsichtig neutralisierte. — —

Mehrfach habe ich versucht, einer ammoniakalisch-wässerigen Prodigiosinlösung den Farbstoff durch Schütteln mit Aether wieder zu entziehen, und es gelang mir, wenn auch nur sehr langsam, etwa die Hälfte des Pigments in den Aether überzuführen. Hatte man aber vorher die mit wässerigem Ammoniak erhaltene gelbe Prodigiosinlösung durch Erwärmen in die rote übergeführt, so gelang es mir beim Schütteln derselben mit Aether, gleichviel ob von letzterem viel oder weniger genommen war, niemals, auch nur eine Spur von Prodigiosin in den Aether überzuführen, während sich das ausgefallene und getrocknete Pigment (Prodigiosin wie Paraprodigiosin) leicht in Aether löste.

Dieselben Resultate erhielt ich, als ich zur Herstellung der wässerigen Pigmentlösung an Stelle von Ammoniak, Natron- und Kalilauge in Anwendung brachte.

II. In alkoholischer Lösung.

Ueber das Verhalten des Prodigiosins gegen Alkali in der alkoholischen Lösung ist nicht viel zu sagen. In stark alkoholischer Lösung führen schon sehr kleine Alkalimengen die gelbrote Lösung in eine reingelbe über, und wie oben gesehen, verwandelt Wasser auch ziemlich alkalireiche, alkoholische Lösungen mit Leichtigkeit in rote Flüssigkeiten.

Es verdient als merkwürdig erwähnt zu werden, dass die Wärme rote, alkoholisch-wässerige, schwach

alkalische Lösungen gelber färbt, während in rein wässerig-alkalischen Lösungen die Wärme den Uebergang in rot beschleunigt.

III. In ätherischer Lösung.

Gelbbraune, ätherische Lösungen werden durch Alkali reiner gelb, gerade wie durch Wasser. Rein gelbe ätherische Lösungen werden nicht durch Alkali verändert. Schüttelt man eine gelbe ätherische Lösung mit alkalischem Wasser oder mit Wasser, das Carbonate oder Bicarbonate enthält, so färbt sich nach und nach der Aether rot. Das Wasser zeigt bald eine blassrosa Farbe, bald bleibt es farblos. Die Reaktion verläuft namentlich bei Verwendung von wenig reiner Natronlauge sehr langsam, es treten starke Emulsionen auf, und es ist starkes Schütteln nötig. Das Pigment bevorzugt weder Wasser noch den Aether in ausgesprochener Weise.

Setzt man aber jetzt einige ccm starke Natronlauge hinzu, so verschwinden die Emulsionen, und das Pigment geht mit roter Farbe in den Aether, das Wasser entfärbt sich. Wir haben also ein ganz ähnliches Verhalten gegen Alkalien als wie gegen Säuren. In sehr schwach alkalischem Wasser ist das Pigment unter Rotfärbung löslich wie in schwach saurem Wasser. Bei sehr starkem Alkalizusatz nimmt hingegen der Aether den Farbstoff auf. Endlich in dem oben geschilderten Zwischenstadium ist etwas von dem roten Pigmente im Wasser wie in Aether gelöst, während in reinem Wasser der gelb in Aether gelöste Körper vollständig unlöslich ist.

Der beim Schütteln entstandene rote Körper ist Paraprodigiosin.

Ueber das Verhalten der ätherischen Lösungen des Prodigiosins gegen Würzburger Leitungswasser.

Eine jede gelbe oder gelbbraune ätherische Lösung wird durch Würzburger Leitungswasser, welches ca. 800 mgr Rückstand (darunter viel Calciumbicarbonat- und sulfat, kleine Mengen Chloride und wenig Kohlensäure) enthält, beim Schütteln auffallender Weise fast sofort gerötet. Das Wasser bleibt farblos, der Aether wird rot, ohne dass nennenswerte Emulsionen entstehen.

Wie ist dies zu erklären?

Die nächstliegende Annahme, dass dieses eine Säurewirkung des Wassers sei, (das Wasser reagiert schwach sauer auf Phenolphtalein) ist leicht zu widerlegen, denn erstens würde ein ganz schwachsaures Wasser eine gelbe, ätherische Lösung nicht röten, im Gegenteil, es zerstört ja Wasser die Rotfärbung einer schwach sauren roten Aetherlösung. Zweitens haben wir uns direct davon überzeugt, dass, wenn man dem Leitungswasser soviel Alkali zusetzt, dass es gegen Phenolphtalein schwach alkalisch reagiert, es noch seine schwach rötende Wirkung gegen gelbe Prodigiosinlösung beibehält. Das schwach alkalisch gemachte Leitungswasser wirkt jetzt aber auch offenbar mindestens nicht durch seine Alkalität allein, denn ein destilliertes Wasser mit dem gleichen Alkalizusatz rötet den Aether sehr viel langsamer und ganz unvoll-

ständig; es sind also offenbar die Salze des Wassers beteiligt.

Der durch Leitungswasser entstandene rote Körper ist durch weitere Alkalimengen nicht gelb zu färben. Er ist also Paraprodigiosin. Man kann die abgehobene ätherische Lösung mit kleinen Mengen Alkali oder Säure behandeln, ohne dass die Farbe sich ändert. Gibt man aber einige Tropfen starke Salzsäure zu dem roten Aether, so ist damit das Paraprodigiosin wieder in normales Prodigiosin verwandelt, es reagiert nun sofort gegen Alkali durch Gelbfärbung.

Uebrigens haben wir durch wässerige Natroncarbonate resp. Bicarbonate niemals eine so rasche und intensive Rötung des Aethers hervorbringen können, als wie durch Leitungswasser.

Endlich bemerke ich noch, dass Gypslösung weder konzentriert noch verdünnt merklich auf eine gelbe, ätherische Lösung einwirkt. Der Gypsgehalt kann also allein die Wirkung des Leitungswassers auch nicht erklären.

Ich möchte mir noch einen Umstand zu erwähnen erlauben. Es trat jedesmal bei der Behandlung einer gelben ätherischen Lösung mit Leitungswasser eine deutliche Fluorescenz auf. Es ist mir das erst am Ende meiner Arbeit aufgefallen, so dass ich nicht sagen kann, ob diese Reaktion eine constante oder eine charakteristische Eigenschaft des Paraprodigiosins ist.

Ich habe als Analogon zu dem Experiment auf pag. 63 den Versuch gemacht, einer gelben, ammoniakalisch-ätherischen Pigmentlösung durch Schütteln mit Wasser den Farbstoff zu entziehen. Das Resultat war

ein völlig negatives, gleichviel, in welchen Quantitäten die beiden Flüssigkeiten zur Anwendung kamen. Auch Erwärmen blieb ohne Einfluss.

Endlich wurde auch noch ein dritter Versuch gemacht, bei welchem mit Kalilauge an Stelle des Ammoniaks gearbeitet wurde. Auch hier war das Resultat dasselbe wie früher.

Versuche, um ein festes, stabiles, gelbes Pigment zu erhalten.

Mehrfach haben wir wässerige oder alkoholische, mit Alkali oder Ammoniak versetzte Lösungen eingedampft, um ein salzartiges, gelbes, festes Produkt zu erhalten. Nur ganz selten waren die Ergebnisse leidlich befriedigend; bei Anwendung von Ammoniak wurden rote, bei Anwendung von Natronlauge meist zersetzte Produkte erhalten.

Verhalten des Prodigiosins gegen Aceton, Essigäther, Chloroform, Schwefelkohlenstoff und einige andere Lösungsmittel.

Aceton. Die interessantesten Resultate erhielt ich mit Aceton. Zwei von verschiedenen Firmen bezogene, angeblich reine Acetone, lösten das trockene rote Pigment (durch Verdunsten einer gelben, ätherischen Lösung erhalten) mit rein hellgelber Farbe, hingegen ein drittes Aceton mit roter Farbe.

Die beiden gelben Acetonlösungen wurden durch verhältnismässig wenig reines Wasser intensiv gerötet. Eine gelbe Acetonlösung verhält sich also einmal wie eine gelbe, wässrig-alkalische oder auch wie eine gelbrote, alkoholische Lösung gegen Wasser.

Es ist nun festzustellen, ob die Acetonlösung ihre gelbe Farbe ähnlich wie die gelbe ätherische Lösung einer speciellen Eigenschaft des Acetons als Lösungsmittel oder einem Alkaligehalte des Acetons verdankte. Ein Alkaligehalt des Acetons erschien, wenn man an organische Basen (Pyridin etc.) dachte, nicht gerade unmöglich. Die Prüfung der Reaktion dieses gelblösenden Acetons ergab folgende Resultate.

a) Mit Lackmustinctur liess sich weder in der konzentrierten noch in mit Wasser verdünnter Lösung eine merklich saure oder alkalische Reaktion feststellen; reinstes von *Merck* bezogenes Lackmus wurde schwach blau gefärbt.

b) Auf Luteol und Rosolsäure wirkte das Aceton wie ein Alkali.

Zu der Prüfung mit Rosolsäure will ich noch bemerken, dass auf Zusatz von reinem Wasser die Lösung aus gelb nie recht in rot, sondern immer nur in orange sich veränderte, und dass das kleinste Tröpfchen $^1/_{10}$ Lauge sofort mit Leichtigkeit eine stark carminrote Färbung hervorbrachte. Demnach ist auch die Wirkung auf Rosolsäure selbst bei starkem Wasserzusatz keine unzweifelhaft alkalische.

c) Gegen Phenolphtalein hingegen verhielt sich Aceton wie eine Säure.

Im Einzelnen waren die Reaktionen die folgenden:

a) Rosolsäure färbt eine unverdünnte Acetonlösung gelb, durch Wasser geht die gelbe Farbe in eine rote über.

b) Luteol färbt Acetonlösung gar nicht, auf Wasserzusatz tritt eine intensive Gelbfärbung auf, was also eine alkalische Reaktion andeutet.

c) Stellt man durch Zusatz geringer Alkalimengen zu einer Phenolphtaleinlösung eine schwach-alkalische, kräftig rote Phenolphtaleinlösung her, so verschwindet die Farbe schon nach Zusatz von wenig Aceton. Dasselbe verhielt sich also gegen Phenolphtalein wie eine Säure.

Einen Entscheid, ob das Aceton mit dem Prodigiosin eine gelbe, durch Wasser dissociierbare Verbindung bildet wie Alkohol, oder ob es durch seinen Alkaligehalt die gelbe Farbe hervorbringt, wage ich heute nicht zu treffen.

Das 3. Aceton nun, welches Rotfärbung hervorbrachte, verhielt sich gegen Luteol als Säure, und eine Probe des Prodigiosin gelblösenden Acetons vorsichtig mit soviel verdünnter Schwefelsäure versetzt, dass eben die Luteolreaktion ausblieb, löste das Pigment ebenfalls rot.

Unser reines Aceton verhielt sich also gegen Indikatoren, als ob es etwa ein Bicarbonat enthielte, und Bicarbonate genügen, um eine rote, alkoholische Prodigiosinlösung gelb zu färben. Es ist also durchaus möglich, dass die Farbe der Acetonlösung durch einen Gehalt eines ähnlich wie Bicarbonat wirkenden Alkalis bedingt wird.

Essigäther. Auch das Verhalten des Pigments gegen Essigäther muss als interessant bezeichnet werden. Die Lösung war gelbrot, ähnlich der ätherischen, obwohl der Essigäther mit Lackmus, Phenolph-

talein und Luteol entschieden sauer reagierte, sodass man wohl annehmen darf, dass ein völlig säurefreier Essigäther den Farbstoff rein gelb wie Aether und Aceton auflöst. Das Spectrum glich ganz demjenigen der Aetherlösung (vgl. „Spectroscopische Studien etc.“). Auch gegen Säure, Alkali und Chlorcalcium verhielt sich die Lösung wie eine ätherische, beim Erwärmen veränderte sie sich nicht, verdunstet, restierte normales rotes Prodigiosin.

Chloroform. Neutrales Chloroform gibt eine purpurrote Lösung, die sich mit Säuren mehr blaurot, mit Alkalien gelb färbt. Die Spectra entsprachen im wesentlichen denen einer alkoholischen Lösung.

Gegen Methyl- und Amylalkohol verhält sich der Körper wie gegen Aethylalkohol; die Lösung in Methylalkohol ist mehr granatrot, die in Amylalkohol mehr carminrot. Chlorcalcium war auf beide Lösungen ohne Einfluss, so lange kein Wasser hinzugesetzt wurde.

Schwefelkohlenstoff gab eine granatrote Lösung. In Benzin ging die Lösung ausserordentlich rasch vor sich. Es tritt hier, wie bei Aethylalkohol, mit dem es sich auch sonst ganz gleich verhielt, beim Erwärmen ebenfalls ein Hellerwerden der Lösung auf.

Benzol wurde durch Schütteln mit destilliertem Wasser säurefrei gemacht und verhielt sich alsdann gegen das Pigment wie Aethylalkohol.

Ich habe, ähnlich wie bei der alkalisch-ätherischen Lösung noch folgende Versuche mit der Benzollösung gemacht, um die Frage beantworten zu können: Gelingt es, aus einer gelben, ammoniakalischen Benzollösung

den Farbstoff durch Schütteln mit Wasser in letzteres überzuführen? Das Resultat entsprach ganz dem bei der ätherischen Lösung erhaltenen, denn es ging auch nicht eine Spur von Pigment in das Wasser über. — Der Versuch wurde alsdann statt mit Ammoniak mit Kalilauge erneuert, und dabei einmal reichlich, das andere Mal nur wenig Alkali genommen, auch auf kaltem und auf warmem Wege wurden die Versuche wiederholt, das Resultat blieb sich stets gleich, das Wasser blieb vollkommen farblos.

Natürlich wurde nun auch der umgekehrte Versuch gemacht, um zu sehen, ob es möglich sei, einer wässerig-ammoniakalischen Pigmentlösung den Farbstoff durch Schütteln mit Benzol zu entziehen. Auch hier war der Erfolg wie früher bei Aether: Es ging etwa ein gutes Drittel — bei Aether die Hälfte — des Farbstoffes in Benzol über. Dasselbe Resultat wurde mit Kalilauge erzielt.

Auch Nitrobenzol gab eine granatrote Lösung; bemerkenswert ist, dass die Lösung beim Erwärmen dunkler, nach längerem Kochen braunrot wurde.

Anilin wurde vor seiner Anwendung destilliert und so fast wasserhell gewonnen. Auch dieses Lösungsmittel verhielt sich alsdann wie Alkohol. Schüttelte man die rote Anilinlösung mit Wasser, so blieb sie rot, mit Aether geschüttelt, wurde sie jedoch gelb.[1]) Setzte man alsdann mehr Anilin hinzu, färbte sich dasselbe blaurot, und wenn man jetzt mit destilliertem

[1]) Dies ist auch ein Beweis dafür, dass die gelbe Farbe der Aetherlösung nichts mit Alkali zu thun hat, sondern dem Aether als solchen zukommt.

Wasser schüttelte, erhielt man eine gelbe, mit Leitungswasser jedoch eine rote Lösung.

Auch mit Xylol, Petroleum-Aether und Glycerin wurden granatrote Lösungen erhalten.

Aldehyd war etwas sauer und löste das Pigment dementsprechend mit schwach-blauroter Farbe, verhielt sich aber sonst wie Alkohol.

In Olivenöl wie in allen fetten Oelen, löste sich das Pigment etwas schwieriger wie in ätherischen Oelen.

Die Lösungen in Terpentinöl und Lavendelöl wurden nach längerem Kochen immer heller und schliesslich farblos, die Farbe kehrte aber nach dem Abkühlen fast vollständig wieder zurück. Diese interessante Beobachtung wurde leider zu verfolgen übersehen.

Versuch, das Pigment zu oxydieren.

Weder durch Einleiten von Sauerstoff, noch durch Wasserstoffsuperoxyd vermochte ich in alkoholischer oder ätherischer Pigmentlösung eine Wirkung zu erzielen. Als ich dagegen zu einer ätherischen Prodigiosinlösung Wasserstoffsuperoxyd und reinen Eisenvitriol in wässeriger Lösung hinzufügte, und vorsichtig erwärmte, wurde unter lebhafter Sauerstoffentwickelung der Farbstoff entschieden etwas verändert. Ich erhielt ein graubraunes Häutchen, das auf der Flüssigkeit schwimmt, und das nach sorgfältigem Auswaschen mit Wasser die merkwürdige Eigenschaft besass, in Alkohol weder in der Kälte noch in der Wärme löslich zu sein. Dagegen löste es sich leicht und völlig in Aether mit bräunlicher Farbe. Beim Verdunsten der

ätherischen Lösung verblieb auf dem Uhrglas eine grau-braune schmutzige Masse.

Das Resultat dieser Versuche ermutigte mich zu ihrer Fortsetzung nicht.

Reduction und Reoxydation des Pigmentes.

Lässt man auf eine rote alkoholische oder auf eine gelbe ätherische Farbstofflösung Wasserstoff in Statu nascendi — erhalten durch Zusatz von Zink zu Salzsäure — einwirken, so wird die erstere Lösung sehr schnell, die letztere etwas langsamer entfärbt. *Schneider* will zwar mit Bacter. prodigios. keine Reduction erhalten haben, während sie von *Scheurlen* und *Rosenberg* bestätigt wird. Es wirkt aber nur nascierender Wasserstoff in dieser Weise.

Hierauf wurde der Versuch einer Reoxydation vorgenommen. Zunächst wurde hierbei der Luft-Sauerstoff in Anwendung gebracht, d. h., es wurde farblose, alkoholische und später auch ätherische Pigmentlösung auf Filtrierpapier gegossen und trocknen gelassen. Es trat jedoch weder bei der einen noch bei der anderen Lösung eine Färbung des Papiers auf. —

Endlich vermochte ich auch nicht das Pigment zu regenieren durch Behandeln der Lösungen mit Wasserstoffsuperoxyd, für sich allein und in Verbindung mit Eisensalzen.

Ich muss also *Schneider's* Mitteilung bestätigen, der eine Reoxydation des Pigmentes bei Bacter. prodigios. nicht constatieren konnte, während ihm diese bei Bact. kiliense gelang. Auch *Rosenberg* ist die

Reoxydation nur mit Bact. indic. schwach gelungen, ebenso hat *Scheurlen* nur negative Resultate erzielt.

Spectroscopische Studien über Prodigiosin.[1])

Rosenberg hat schon mit Herrn Prof. *Lehmann* eingehend versucht, durch Anwendung des Spectralapparates grössere Klarheit in die erhaltenen Resultate zu bringen.

Auch wir haben ausserordentlich viel, namentlich in der ersten Zeit, spectroscopische Untersuchungen angestellt, bis es klar wurde, dass auf diesem Wege nichts Wesentliches zu gewinnen war. —

Es lassen sich nur zwei charakteristische, von einander verschiedene Spectra erkennen.

I. Das Spectrum des festen, roten Prodigiosins. Dasselbe ist identisch mit:

a) dem Spectrum der roten Lösung in Benzol, Benzin, Terpentinöl, Olivenöl und in ätherischen Oelen.

b) dem Spectrum der angesäuerten Lösung in Alkohol, Aether und Aceton.

c) dem Spectrum des durch Wasser und Wärme aus der gelbroten, alkalischen, wässerigen oder ätherischen Lösung abgespaltenen Körpers, d. h. die Spectren des Prodigiosins und des Paraprodigiosins waren gleich in allen Lösungsmitteln, welche eine carminrote Farbe der Lösung gaben.

[1]) Das hygienische Institut stellte mir einen Spectralapparat zur Verfügung, bei welchem die C-Linie bei 9, die D-Linie bei 11,6, die E-Linie bei 15,2, die B-Linie bei 15,8 und die F-Linie bei 18,5 lag, während die entsprechenden Zahlen bei *Bunsen* und *Kirchhoff* 20, 50, 90, 98 und 129 sind.

Es lässt sich von all diesen Spectren nicht unterscheiden das Spectrum der granatroten alkoholischen Lösung (was *Rosenberg* noch versuchte). Diese Lösung und ihr Spectrum verhalten sich gerade so, als ob eine kleine Menge Alkali der roten Lösung zugesetzt wäre; es bildet dieses Spectrum einen Uebergang zu den gleich zu beschreibenden Spectren der gelben Lösungen.

Ebenso wenig lässt sich für die durch Auftreten des oben beschriebenen violetten Zersetzungskörpers erhaltenen Lösungen ein besonderes Spectrum angeben. Sicher würde der rein dargestellte violette Körper ein besonderes Spectrum geben bei Darstellung in grösserer Menge, und das Studium seines Spectrums muss weiteren Arbeiten vorbehalten bleiben. — — —

II. Das Spectrum der gelb-ätherischen Lösungen, der gelben Acetonlösungen und der durch Alkali erzeugten gelben, wässerigen, ätherischen und alkoholischen Lösungen. Die braunen und gelbroten Flüssigkeiten zeigen Uebergänge vom gelben zum roten Spectrum.

Die gelbgefärbten Culturen, direkt spectroscopiert zwischen Glasplatten, zeigen die Farbe der gelben Lösungen; sowie die Culturen rot geworden sind, zeigen sie wieder das Spectrum des roten Prodigiosins.

Ich gebe nun in der Tabelle zuerst die Abbildungen der Spectra des roten Prodigiosins, erhalten durch successive Verdünnung einer 1 % Prodigiosinlösung im schwachsauren Alkohol. Zur Veranschaulichung

der Spectra der gelben Prodigiosinlösungen möge das einer 1 % ätherischen Lösung dienen, bei der durch Zusatz einer Kleinigkeit Alkali die braungelbe Farbe in reines Gelb verwandelt wurde.[1])

Was die Bänder selbst anbelangt, so will ich dazu folgendes bemerken:

1. **Rote Prodigiosinlösung** in schwachsaurem Alkohol.

a) Concentration: = 1 % Lösung.
Wir bekommen hier nur ein starkes Band beginnend bei 11,5 und bis zu Ende reichend. Von 11,5 bis 16,5 ist es besonders stark.

b) Concentration = $^1/_2$ %.
Wir bemerken hier dasselbe Band, jedoch lichter geworden. Es beginnt auch erst bei 12,6 und ist bis 17,5 sehr kräftig.

c) Concentration = $^1/_4$ %.
Bei dieser 0,25 % Lösung setzt das Band bei 13 noch ziemlich kräftig ein und bleibt auch so bis 15,2, alsdann hellt es sich aber sehr merklich auf.

d) Concentration = $^1/_8$ %.
Hier haben wir nun zwei Bänder vor uns, ein noch ziemlich starkes von 13,6—15 reichend, und ein zweites, ziemlich verschwommenes von 17—18. Dazwischen und hinter dem zweiten Band ist völlige Aufhellung.

[1]) *Rosenberg* hat einmal bei einer wässerig-alkalischen Lösung ein Band ganz vorn bemerkt (schon bei 10,8 beginnend). Offenbar handelte es sich hier um ein Zersetzungsprodukt. Das Band ist uns nie aufgestossen.

2. **Gelbe Prodigiosinlösung** in schwach alkalischem Aether.

a) Concentration = 1% Lösung.
Hier haben wir von vornherein zwei Bänder vor uns. Das erste Band von 12,5 bis 13,2 ist nur ganz verschwommen, daran schliesst sich das zweite starke Band, das gleichmässig kräftig bis zu Ende verläuft.

b) Concentration = $^1/_2$%.
Hier hat sich das Band von B geteilt, während das schwache Vorband ganz verschwunden ist. Wir haben somit von 14 bis 15,4 ein kräftiges und von 17,3 ein zweites kräftiges Band, welches namentlich von 17,3 bis 19 sehr stark ausgefallen ist. Zwischen 15,4 und 17,3 ist völlige Aufhellung.

c) Concentration = $^1/_4$%.
Bei dieser Verdünnung haben wir auch noch zwei Bänder vor uns, nämlich ein noch relativ kräftiges erstes Band von 14,2 bis 15,2 und ein zweites von 17,8 bis zu Ende führend, letzteres allerdings schon sehr schwach.

d) Concentration = $^1/_8$%.
Hier vermag man von 14,4 bis 15,2 noch ein schwaches Band ziemlich gut zu erkennen. Hierauf folgt bis 18,2 vollkommene Aufhellung, worauf das Bild bis zu Ende verwaschen ist.

Spectral-Analyse des Prodigiosins.

1. **Rote Prodigiosinlösung** in schwachsaurem Alkohol } Concentration = 1 %

2. Idem. $^1/_2$ %

3. — Idem. $^1/_4$ %

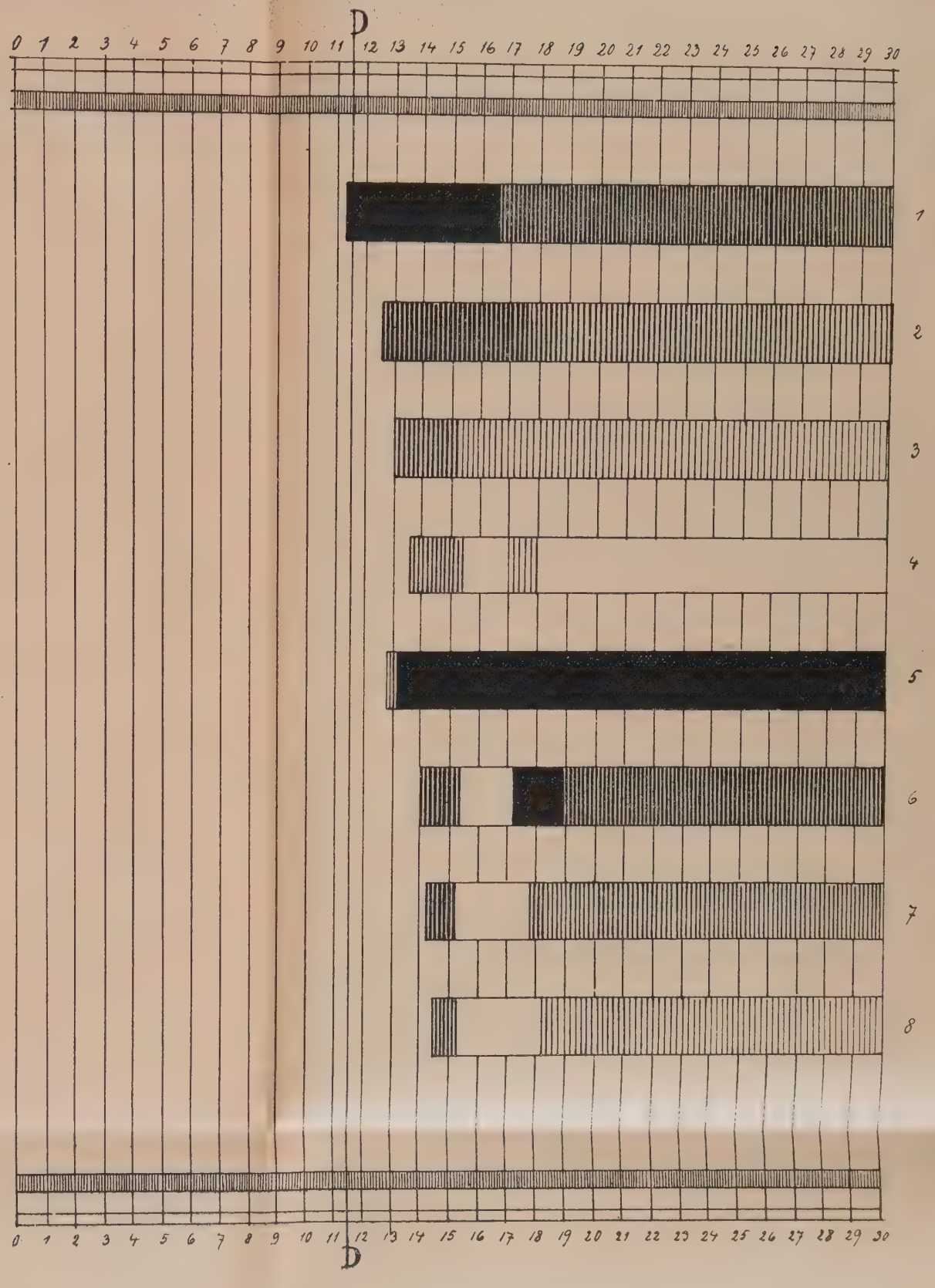
4. — Idem. $^1/_8$ %

5. **Gelbe Prodigiosinlösung** in schwach alkalischem Aether } Concentration = 1 %

6. — Idem. $^1/_2$ %

7. — Idem. $^1/_4$ %

8. — Idem. $^1/_{18}$ %



Aschen-Bestimmung des Pigmentes.

Ich habe in der Literatur nur bei *Scheurlen* hierüber eine Angabe gefunden, und war etwas überrascht, dass genannter Forscher bei einem Körper, der sich so ausserordentlich leicht und glatt in Aether löst, in dem einen Falle 14 % und in einem zweiten 16 % Asche bestimmt hatte.

Dies veranlasste mich daher, auf zwei Bedingungen den grössten Wert zu legen, d. h. einmal ein möglichst reines Präparat zu veraschen, sodann aber den Körper so trocken als möglich zu bekommen. Ich arbeitete also nur mit frisch über Chlorcalcium destilliertem Aether und verfuhr so, wie ich das an früherer Stelle bereits eingehend beschrieben habe. Ich begnügte mich jedoch damit noch nicht, sondern stellte das Pigment, um auch die letzten Spuren von Feuchtigkeit zu entfernen, tagelang bei 100° C. in einen Wassertrockenschrank (in gewogenem Platintiegel). Nach dem Abkühlen im Exsiccator wurde gewogen, und das Wiedererhitzen etc. so lange fortgesetzt, bis eine Gewichtsabnahme nicht mehr zu constatieren war. Es gelang mir hierbei doch, bei einer Pigmentmenge von fünf Gramm, welche scheinbar so weit als nur möglich getrocknet war, noch einen Feuchtigkeitsgehalt von 0,092 gr nachzuweisen.

Ich habe zu dem ersten Versuche 4,571 gr trockenes Pigment verwandt. Es sieht dieses Quantum für den, der die Verhältnisse nicht näher kennt, auf den ersten Blick sehr gering aus. Nach meiner Schätzung jedoch gehörten ca. 500 Petrischalen, à 3 Kartoffelscheiben,

d. h., ungefähr 120 qdem Culturfläche zur Gewinnung dieser Menge, also das Arbeitsresultat vieler Tage.

Der Platintiegel wurde zunächst vorsichtig erhitzt, das Pigment brannte dabei anfangs mit hellleuchtender Flamme, gleichzeitig machte sich ein Geruch nach Acrolein bemerkbar, dem erst später ein solcher nach gebranntem Horn folgte. Ersterer Umstand liess auf einen Fettgehalt des Pigmentes, letzterer auf die Anwesenheit von Stickstoff schliessen. Für einen ev. Fettgehalt sprach bekanntlich das fettige, salbenartige Aussehen unseres Pigmentes. Ich habe gleich bei dieser Gelegenheit einen weiteren Versuch angestellt und etwas Pigment in einem Porzellantiegel mit saurem, schwefelsauren Natron erhitzt. Es trat jedoch jetzt der Acroleingeruch weniger scharf auf als vorher.

Nachdem nun mit Wasser extrahiert worden war, erhitzte ich das Pigment in bedecktem Tiegel energischer, mehrere Stunden lang, schliesslich wurde stark geglüht. Nach dem Erkalten wurde mit Wasser abermals extrahiert, abfiltriert und das Filtrat mit dem ersteren zunächst bei Seite gestellt. Filter nebst Inhalt wurden alsdann verascht und im Sandbad nach und nach das vorher erhaltene Filtrat vorsichtig mit der Pipette hinzugefügt, um jeden Verlust durch Spritzen etc. zu vermeiden. Nachdem dann der Tiegel nochmals leicht erwärmt und später in dem Exsiccator gestanden hatte, wurde gewogen. Die 4,571 gr Pigment ergaben 0,045 gr d. h. genau 1 % Asche.[1])

[1]) Der Chlorophylfarbstoff, dessen chemische Zusammensetzung mit derjenigen des Prodigiosins eine gewisse Aehnlichkeit aufweist, enthält nach *Gautier* 1,75 % Asche.

Ich habe alsdann eine zweite Analyse ausgeführt. Beim zweiten Versuche wurden von mir 3,951 gr Pigment verwandt, wovon ich 0,048 gr Asche erhalten habe, d. h. 1,21 %.

Ich darf also wohl den Aschengehalt des Pigmentes als 1,10 % bezeichnen.

In dem Platintiegel blieb ein glasig-sandiger, körniger Rückstand, dem ich etwas Wasser hinzusetzte und hierauf schwach erwärmte. Das Filtrat davon war völlig klar, ein grösserer Teil des Rückstandes blieb ungelöst. Mit dem Filtrat stellte ich folgende Reaktionen an:

1. Mit Höllensteinlösung erhielt ich einen schwachen, in Ammoniak löslichen Niederschlag. Es war also Chlor in kleiner Menge vorhanden.

2. Mit Chlorbaryum gab das Filtrat einen deutlichen weissen Niederschlag, der in Salzsäure völlig löslich war. Schwefelsäure war somit ausgeschlossen.

3. Hierauf wurde ein Teil des Filtrates mit Salpetersäure und molybdänsaurem Ammon erwärmt, worauf die Flüssigkeit deutlich gelb wurde, sodass also eine Reaktion auf Phosphorsäure erhalten war. (*Scheurlen* hat Phosphor nicht nachweisen können.)

4. Der Rückstand wurde alsdann mit Salzsäure übergossen, wobei eine auffallend geringe Kohlensäureentwicklung zu constatieren war.

5. Die Flammenfärbung ergab eine sehr starke Natronflamme.

6. Der mit Salzsäure übergossene Rückstand wurde abfiltriert und dem Filtrat Ferrocyankalium zugesetzt,

es war eine sehr schwache Eisenreaktion zu constatieren.

7. Mit *Nesslers* Reagens konnte Ammoniak sehr deutlich nachgewiesen werden. Eine Kontrollprobe ergab dasselbe Resultat.

Es waren von dem mit Salzsäure übergossenen Rückstande feine, sandige Körnchen zurückgeblieben. Ich spülte dieselbe mit wenig Wasser in den Platintiegel zurück, trocknete glühte und wog. Der Rückstand betrug 0,008 gr. Derselbe wurde mit Salzsäure übergossen und färbte sich sofort schwach gelb. Ein Teil wurde mit Ferrocyankalium rein blau, ein zweiter gab, mit Salpetersäure und molybdänsäurem Ammon erwärmt, einen gelben Niederschlag. Somit war die Anwesenheit von Eisen und Phosphor nochmals nachgewiesen.

Eine Kontrollprüfung des verwendeten Wassers und aller Reagentien ergab völlige Reinheit derselben.

Ich habe übrigens am Schlusse meiner Arbeit eine dritte Aschenbestimmung vorgenommen. Ich veraschte dieses Mal 0,5948 gr Substanz und erhielt 0,0112 gr Asche; das entspräche also einem Aschengehalt von 1,88 %.

Diese Zahl ist etwas höher, als die beiden bereits mitgeteilten, und dürfte der Grund darin liegen, dass ich bei der dritten Analyse nicht so lange erhitzt habe, als bei den beiden ersten Analysen.

Scheurlen's Angabe dürfte ein Schreib- oder Druckfehler, das Komma betreffend, zu Grunde liegen.

Elementar-Analyse.

Zu derselben wurde Material verwendet, das nach der früher beschriebenen Methode so weit gereinigt war, als ich dies vermochte. Ich habe zwei Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen ausgeführt. In der ersten Analyse verarbeitete ich 0,4968 gr Substanz, in der zweiten wurden 0,11 gr verbrannt. Die Methode war die übliche nach *Ludwig Gattermann* (III. Auflage).

Als Resultat erhielt ich:

In Analyse I Wasserstoff 7,72% u. Kohlenstoff 75,58%
„ „ II „ 8,14% „ „ „ 74,93%

Bei den beiden Stickstoffbestimmungen verarbeitete ich zur ersten Analyse 0,418 gr Substanz, bei der zweiten 0,103 gr. Die Resultate waren:

In Analyse I 3,80% und
„ „ II 4,00% } Stickstoff.

Ich erhalte also als Mittelwert aus obigen Verbrennungen folgende Zahlen, wobei ich den gefundenen Aschengehalt (vergl. jenes Kapitel) mit 1,1% berücksichtige:

Kohlenstoff	75,25%
Wasserstoff	7,93%
Sauerstoff	11,82%
Stickstoff	3,90%
Asche	1,10%
Sa.:	100,00%

In der Literatur habe ich nur bei zwei Forschern Angaben über ausgeführte Elementar-Analysen gefunden.

a) *Scheurlen* fand:

Kohlenstoff 71,58 %
Wasserstoff 11,84 %
Sauerstoff 16,58 %
Stickstoff konnte er nicht nachweisen.

b) *Griffiths* gibt folgende Analyse:

Kohlenstoff 70,52 %
Wasserstoff 9,24 %
Sauerstoff 13,20 %
Stickstoff 3,07 %

Vergleicht man die Aschenbestimmung und das Resultat meiner Elementaranalyse mit der prozentualen Zusammensetzung und chemischen Formel einer Reihe ähnlicher Körper, so sieht man, dass mit dem Chlorophyll eine auffallende Aehnlichkeit besteht. Ich habe des Vergleiches wegen noch die Zusammensetzung von Tripalmitin, Oelsäure und Carotin hier angeführt.

	C.	H.	O.	N.
a) Tripalmitin:	76,00	12,00	12,00	— %
b) Oelsäure:	76,30	12,06	11,35	— %
c) Carotin:	84,40	9,30	6,30	— %
d) Chlorophyll:				
nach *Gautier*	73,97	9,80		4,15 %
nach *Hansen*	67,26	10,63		5,12 %

Der geringe Phosphorgehalt des Prodigiosins legt den Gedanken nahe, ob nicht das Prodigiosin vielleicht durch Lecithin oder ein Derivat desselben verunreinigt sei. Da unser Pigment aber, verglichen mit dem Lecithin, nur so ausserordentlich wenig Phosphor enthält, so könnte der Lecithingehalt des Pigmentes nur ein sehr geringer sein. — Quantitative Phosphorbestimmungen

konnten nicht vorgenommen werden, da sich Phosphor nur in Spuren nachweisen liess.

Capillaritäts- und Adsorptions-Erscheinungen.

Angeregt durch Herrn Professor *Lehmann,* der mich auf die schönen Untersuchungen von *Friedrich Goppelsröder* („Capillaranalyse von F. G., Basel, 1901") aufmerksam machte, habe ich mit meinem Pigmente auch Versuche mit der Capillar-Analyse ausgeführt, einmal um auf diese Weise festzustellen, ob es sich in dem roten Pigmente thatsächlich um einen einheitlichen roten Körper handelte, oder ob sich vielleicht in ihm mehrere Componenten auf diese bekanntlich äusserst empfindliche analytische Methode nachweisen liessen. In zweiter Linie sollten die Steighöhen des Pigmentes in verschiedenen Capillarmedien näher untersucht und festgestellt werden. Bei der Schwierigkeit, pflanzliche, unkrystallinische Pigmente zu charakterisieren, schien die ziffermässige Festlegung der Steighöhen unter bestimmten Verhältnissen als ein nicht wertloser Beitrag zu seiner Identifizierung mit anderen schon bekannten, oder noch aufzufindenden Farbstoffen.

Zu diesen Versuchen verwandte ich in erster Linie ein gutes, starkes Filtrierpapier von *Schleicher & Schüll,* welches mir das Institut zur Verfügung stellen konnte, sodann Leinen, Wolle, Baumwolle, Seide und Pergamentpapier. Die Analysen wurden natürlich auch bei annähernd derselben Temperatur, bei gleichem Druck und gleichem Feuchtigkeitsgehalte der Luft ausgeführt, da diese Factoren alle mehr oder weniger das Resultat zu ändern imstande sind.

Nach verschiedenen Vorversuchen stellte ich fest, dass die Lösungen des Farbstoffes nicht zu konzentriert genommen werden durften, da man bei starken Lösungen nur quantitativ geringe Steighöhen und höchst intensive Färbungen erhielt, in denen einzelne Bänder zu erkennen von vornherein unmöglich war.

Das Filtrierpapier und die übrigen Stoffe wurden genau nach *Goppelsröder's* Vorschrift in 3 cm breite gleichlange Streifen geschnitten, jeder an dem einen Ende durch ein eingenähtes Glasstäbchen beschwert und mit dem anderen Ende, 2 cm tief in die betreffende Lösung eingetaucht, der Reihe nach auf einen, in ein Stativ eingeklemmten Glasstab aufgehangen.

Hauptbedingung bei dem ganzen Versuche war natürlich, dass die Lösungen stets mit absolut reinem Material hergestellt waren. Das Pigment wurde also nach den früher beschriebenen Methoden gereinigt und getrocknet, und ebenso wurde die Reinheit von Alkohol und Aether dadurch kontrolliert, dass diese Lösungsmittel selbst vorher einem Capillarversuche unterworfen wurden.

Ich habe die Steighöhen, wie in den Tabellen angegeben, zunächst nach je 5 Minuten, später nach Verlauf von Stunden notiert und schliesslich die Versuche nach 18 Stunden abgebrochen, da sich herausstellte, dass hier das Maximum der Steighöhe erreicht war. Die Bänder wurden dann aus den Lösungen herausgenommen, der untere Teil — soweit er eingetaucht hatte — sofort abgeschnitten, die Streifen möglichst rasch getrocknet und, nachdem die notierten

Zahlen nochmals auf ihre Richtigkeit kontrolliert waren, vor Licht geschützt aufbewahrt. — —

Ich will nun gleich betonen, dass es mir nicht gelungen ist, verschiedene Farbencomponenten in dem Prodigiosin nachzuweisen. Die sämtlichen Farbenfelder, welche ich auf den verschiedenen Medien erhielt, machten sofort den Eindruck eines einheitlichen, roten Farbstoffes. Andeutungen von gelben und bräunlichen Zonen, die ich bei dem ersten Versuche erhielt, mussten als Zersetzungsproducte des normalen Farbstoffes angesehen werden, da dieselben mit einer aus ganz frischem Pigment hergestellten Lösung nicht mehr auftraten.

Im chemischen Teil der Arbeit wird eingehend nachgewiesen, wie ausserordentlich empfindlich der Farbstoff Alkalien und Säuren gegenüber ist. Die geringste Menge Luft-Kohlensäure, Spuren von Ammoniak, welche in der Luft des Arbeitssaales, wo 16 Herren gleichzeitig beschäftigt waren, sicher im Laufe des Tages des Oefteren vorhanden waren, mussten bei einer so überaus empfindlichen Analyse sich bemerkbar machen.

Nicht unerwähnt möchte ich übrigens lassen, dass die Capillaranalyse der gewöhnlichen Tupfmethode ausserordentlich überlegen ist. Wir haben letztere zur Prüfung der Reinheit des Pigmentes wiederholt ausprobiert, und im allgemeinen prüften wir jede ältere, uns etwas zweifelhaft erscheinende Pigmentlösung zuerst so, dass wir uns überzeugten, ob ein Tropfen derselben nach Verdunsten auf Filtrierpapier einen intensiv roten und nicht schmutzigroten Flecken hinterliess.

Wenn der Fleck nicht tadellos carminrot ausfiel, ergaben Steigversuche stets missfarbige Zonen.

Den beiliegenden Tabellen und graphischen Darstellungen habe ich nicht viel zuzufügen. Wie alle anderen Farbstoffe steigt auch Prodigiosin in verdünnten Lösungen höher wie in konzentrierten. Das Endresultat hierbei war, dass das Prodigiosin das Maximum seiner Steighöhe im Wollband erhielt, dann folgte Baumwolle, Filtrierpapier, Seide, Leinen und am niedrigsten fiel die Steighöhe bei Pergamentpapier aus.

Durchgängig erhielt ich mit frischer Pigmentlösung rein carmoisinrote Farb-Zonen. Dieselben hatten meist in $^2/_3$ ihrer Höhe die grösste Dichtigkeit und verblassten allmählich nach oben. Mit nicht frischer Lösung, der man jedoch weder makroscopisch noch mit der Betupfungsmethode eine Zersetzung überhaupt nachweisen konnte, erhielt ich bei der Capillaranalyse in $^3/_4$ Höhe mehrere braune Bänder von verschiedener Stärke, und 3—5 cm über der roten Endschicht zeigten sich einige ganz schwache, gelbe Zonen. —

Ich habe dann einzelne Stückchen aus den Bändern herausgeschnitten und mit Alkohol, Aether, Alkali und Säuren behandelt. Die erhaltenen Reaktionen stimmten, wie erwartet, völlig mit denjenigen überein, die das reine Prodigiosin stets gegeben hatte.

Endlich habe ich in der Tabelle der Versuche mit der alkoholischen Lösung — ein zweiter Versuch ist mit Aether ausgeführt und ebenfalls in Tabellenform aufgezeichnet — auch die Steighöhe des Alkohols überall da mit angegeben, wo ich sie sicher erkennen konnte. Es ist dazu zu bemerken, dass das Lösungs-

mittel nicht mit dem Pigment gemeinsam, sondern stets schneller und dementsprechend auch höher stieg, sodass also der Farbstoff stets zurückblieb.

Bemerken möchte ich schliesslich noch, dass die Vergleiche der erhaltenen Steighöhen mit denjenigen anderer, ähnlicher Pigmente irgend welche weitere Schlussfolgerungen leider nicht zuliessen.

I. Capillarversuch

mit roter, alkoholischer Prodigiosin-Lösung bei 17° C.

(Die konzentrierte Lösung enthielt $^1/_4$ %, die verdünnte $^1/_{16}$ % trockenes Pigment.)

Notiert nach Verlauf von	Wolle			Baumwolle			Filtrierpapier			Seide			Leinen			Pergamentpapier		
	Pigment		Alkoh.	Pigment		Alkoh.	Pigment		Alkoh.	Pigment		Alkoh.	Pigment		Alkoh.	Pigment		Alkoh.
	konz.	verd.		konz.	verd.		konz.	verd.		konz.	verd.		konz.	verd.		konz.	verd.	
	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm
5 Min.	8,8	9,8	—	5,8	6,3	8,4	5,1	5,5	7,4	5,1	6,1	6,3	4,8	4,9	5,6	1,6	2,—	—
10 „	9,3	10,—	—	6,1	7,—	8,8	5,4	5,9	7,9	5,3	6,6	7,—	5,1	5,2	6,—	2,-	2,5	—
30 „	9,4	10,2	—	6,2	7,2	9,5	5,6	6,8	8,4	5,4	6,7	7,3	5,4	5,5	6,4	2,3	2,8	—
1 Stde.	9,7	10,4	—	6,3	7,5	9,7	5,8	6,8	9,6	5,7	6,8	7,6	5,5	5,9	7,4	2,3	3,—	—
5 Stdn.	10,5	11,0	—	6,3	7,8	10,8	5,9	7,—	10,3	5,8	7,-	8,—	5,8	6,2	7,7	2,4	3,1	—
18 „	12,2	13,8	–	6,4	7,9	12,8	6,1	7,2	13,2	5,8	7,—	8,4	5,8	6,8	8,6	2,4	3,1	-

II. Capillarversuch

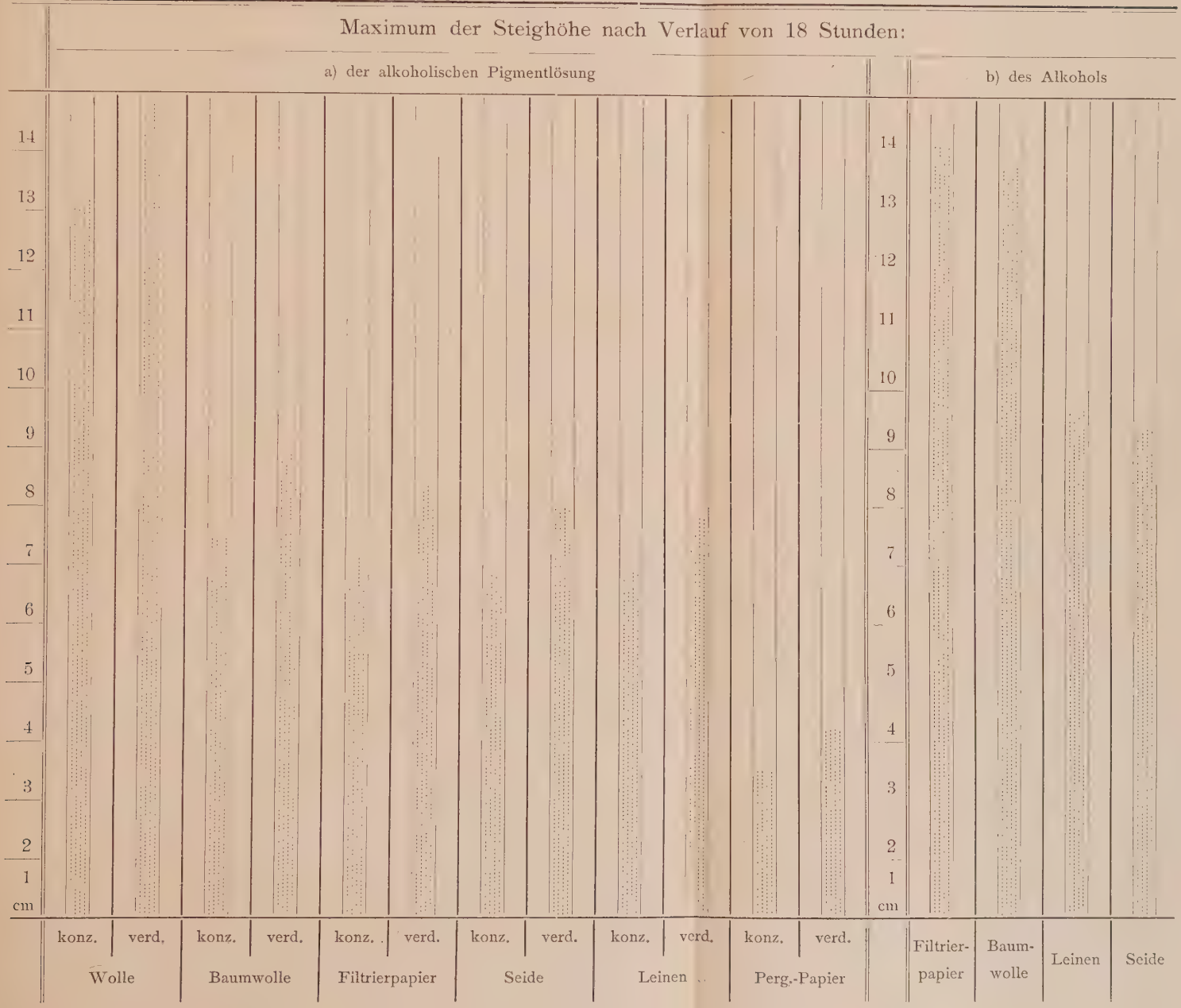
mit gelber, ätherischer Prodigiosin-Lösung von derselben Stärke.

5 Min.	10.2	11.8	–	7,4	8,3	—	5,2	6,—		5,8	6,7	—	5.2	6,3	—	1,8	2,2	—
10 „	11,4	13,2	—	8,2	8,9	—	7,—	6,9	—	7,—	7,7	—	7,1	7,9	-	2,3	2,6	—
30 „	11,8	15,—	—	8.6	9,8	—	8,2	8,6	—	7,9	8,6	—	7,9	8,6	—	2,5	3,—	—
1 Stde.	14,—	16,4	.	10,4	10,4	—	9,2	9,4	—	8,4	9,4	–	8,3	9,7	—	2.6	3,4	—
5 Stdn.	15.7	17,9	—	10,4	12,9	—	10,4	10,7		9,8	11.7	–	10,4	10,7	—	2.8	3,6	—
18 „	17.6	19.2	—	12,8	13,2	—	11,4	11,9	—	11,9	12,6	–	11.3	11.6	—	3,—	3.8	–

I. Capillar-Versuch

mit röter, alkoholischer Prodigiosin-Lösung bei 17° C.

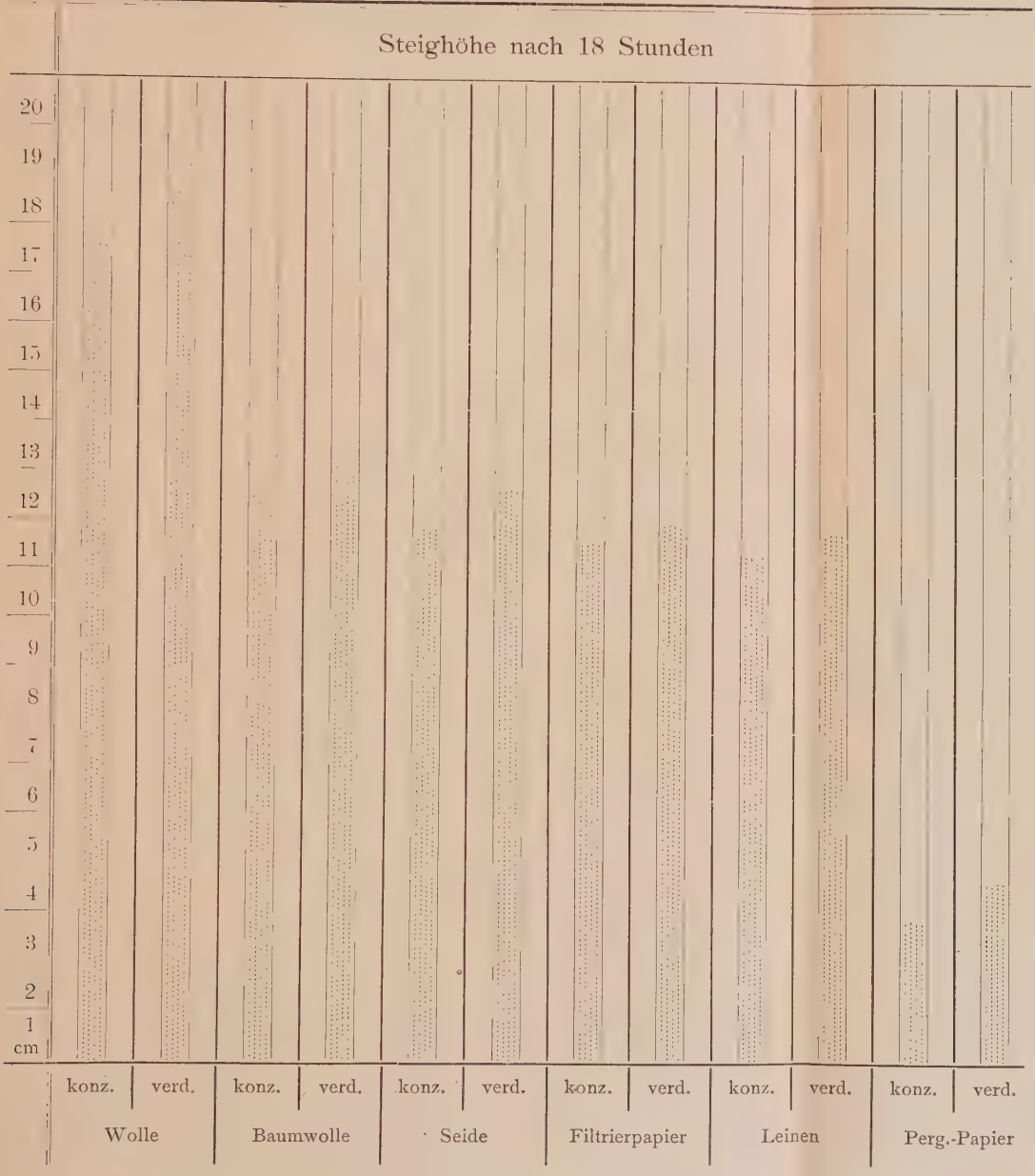
(Konzentrierte Lösung $^1/_4$ %; verdünnte Lösung $^1/_{16}$ %.)



II. Capillar-Versuch

mit gelber, ätherischer Prodigiosin-Lösung.

Konzentrierte Lösung $^1/_4$ %; verdünnte Lösung $^1/_{16}$ %.



Uebersicht der Hauptergebnisse.[1])

1. Die Farbe der Culturen des Bacterium prodigiosum von gleichem Stamme, auf dem gleichen Nährboden (Kartoffel) kann, wie bekannt, von hellorange bis dunkelcarminrot schwanken. Die verschiedene Farbe ist bedingt durch einen verschiedenen Alkaligehalt. Dem stärksten Gehalte an Alkali entspricht die orangegelbe Farbe, doch sind auch die carminroten Culturen auf Kartoffel niemals sauer, sondern stets alkalisch. Es wird unten gezeigt, dass nur bei erheblicher Concentration des Alkalis die gelbe Verbindung des Prodigiosins mit Alkali beständig ist, im übrigen aber schon vom Wasser gespalten wird. Da junge Culturen mehr Alkali bilden als alte, erklärt sich, dass häufig Kartoffelculturen anfangs orange, später carminrot gefärbt sind. (Vgl. pag. 10 und 45.)

2. Eine saure Reaktion wurde nur bei älteren roten Culturen auf Milchreis erhalten, offenbar infolge Säurebildung des Bact. prodig. aus dem Zucker. (Pag. 18—19.)

3. Lebende Kartoffelculturen färben sich, gleichgiltig, ob sie anfangs carminrot oder orangegelb sind, dem Sonnenlichte während vierzehn Tagen ausgesetzt, von Tag zu Tag dunkler braunrot, ohne dabei vollständig abzusterben, ja, aus den braunroten Culturmassen lässt sich Prodigiosin von normalen Eigen-

[1]) Von dieser Uebersicht haben wir principiell ausgeschlossen viele in der Arbeit niedergelegte Einzelbeobachtungen, welche bei unserer jetzigen Einsicht in die Natur des Prodigiosins noch nicht verständlich sind, welche aber zum Teil wichtige Fingerzeige für weitere Studien abgeben dürften.

schaften gewinnen. (Pag. 11—12.) Der Farbstoff wird, wenn er nicht aus der Bacterienzelle entfernt ist, demnach durch Licht nicht zerstört.

4. Ein constanter Einfluss des zerstreuten Tageslichtes auf das Wachstum und die Farbstoffbildung der Culturen lässt sich nicht nachweisen. (Pag. 12.)

5. Metallglanz zeigen die Culturen namentlich auf ziemlich trocknen Nährböden. Bestreicht man Kartoffel mit Bouillonaufschwemmung von Bacterien, so erhält man häufig schleimige, farbstoffarme, für die Zwecke der Farbstoffgewinnung gänzlich unbrauchbare Culturen. Eine ähnliche Verschleimung zeigen die Culturen nicht selten auch dann, wenn die Culturmassen in gewöhnlicher Weise immer wieder von Kartoffel auf Kartoffel übertragen wurden. Zwischenschalten von Agarculturen scheint zweckmässig. (Pag. 15—16.)

6. Aus den Stoffwechselversuchen (vergl. pag. 21—35) folgt namentlich:

a) Unser weisser Stamm von Bacter. prodig. bildet stärker Kohlensäure und meist auch etwas stärker Ammoniak als der rote.

b) Die Kohlensäure-Production ist auf stärkehaltigen Nährböden ausserordentlich viel reicher als auf Gelatine- und Agar-Nährböden.

c) Im Gegensatz zu *Scheurlen* lässt sich mit Leichtigkeit nachweisen, dass Bacter. prodig. auch auf carbonatfreien Nährböden reichlich Kohlensäure bildet.

Eine ausführliche Zusammenfassung dieser Versuche findet sich auf pag. 35.

7. Prodigiosin, nach den verschiedensten Methoden gereinigt, behält noch weiche Consistenz und ist bisher niemals krystallinisch erhalten worden. (Pag. 39—42.)

8. Die Ausbeute an Prodigiosin aus getrockneten Culturen betrug etwa 1%. Die Färbekraft ist etwa 50 mal schwächer als die des Fuchsins. Die Haltbarkeit des trockenen Pigmentes bei Lichtabschluss ist eine befriedigende. Im Licht verblassen Prodigiosin-Lösungen und mit Prodigiosin gefärbtes Papier sehr rasch. (Pag. 43—45.)

9. Wie nach 1. zu erwarten, liefern gelbe und rote Kartoffelculturen das gleiche Prodigiosin. Für die Farbe des alkoholischen Auszugs der Culturen kommt in hohem Masse einmal die alkalische Reaktion der Prodigiosum-Kartoffel, zweitens die meist schwachsaure Reaktion des verwendeten Alkohols in Betracht. Die alkoholische Lösung ist schon bei sehr geringem Säureüberschuss rot. — Prodigiosin ist in alkoholischer Lösung ein sehr empfindlicher Indikator. (Pag. 45—48.)

10. Unter diesen Umständen ist nicht mit absoluter Sicherheit zu sagen, welches die Farbe einer neutralen, alkoholischen Lösung ist. Am wahrscheinlichsten ist sie eine Zwischenfarbe zwischen gelb und rot, etwa granatrot. (Pag. 49.)

11. Wasserzusatz färbt eine alkoholische, möglichst neutrale, granatrote resp. bei Anwesenheit nennenswerter Alkalimengen gelbe Lösung sofort carminrot. Die Verbindung des Prodigiosins mit Alkali, die in alkoholischer Lösung schon bei minimalem Alkaliüberschuss beständig ist, wird durch Wasser gespalten. Durch Erwärmen wird die rote Farbe der wässerig

alkoholischen Lösung wieder gegen gelb hin verändert, abkühlen lässt die rote Farbe wieder hervortreten, und dies lässt sich beliebig oft wiederholen. (Pag. 49.)

12. Möglichst reines Prodigiosin in Aether gelöst, ist braungelb, nicht wie in der Literatur meist angegeben, rot. Mit reinem Wasser geschüttelt, nimmt die braungelbe Lösung eine noch etwas hellere, gelbe Farbe an, als ob das Wasser der ätherischen Lösung Säurespuren entzöge.[1]) Ist das Prodigiosin bei seiner Herstellung mit Säuren in Berührung gekommen (Verwendung schwach sauren, käuflichen Alkohols), so wird häufig ein Pigment gewonnen, das sich wegen Anwesenheit von Säurespuren in Aether rot löst. Färbt man auch diesen Aether durch Alkalispuren wieder gelbbraun, so wird er jetzt doch mit Wasser nicht hellgelb, sondern rot; Bildung von Paraprodigiosin — siehe sub 16. — (Pag. 64—66.)

13. Die gelbbraune, ätherische Lösung wird, wenn der Aether Spuren von Wasser enthält, durch Schütteln mit festen Chloriden des Baryum, Calcium oder Natrium gerötet, was oft constatiert, vorläufig aber unerklärlich ist. Der rote Körper wird durch Alkalispuren gebräunt und besteht nicht aus Paraprodigiosin, die Reaktion macht vielmehr den Eindruck einer Säurewirkung. (Pag. 55.)

14. In Wasser ist das Prodigiosin unlöslich, dagegen in schwach angesäuertem Wasser mit carminroter Farbe etwas löslich, in starksaurem Wasser ist es

[1]) Säurespuren färben die gelben Lösungen zuerst wieder bräunlich und erst später rot.

unlöslich, dagegen löst es sich in Eisessig vorzüglich. (Pag. 55—57.) Alkoholische und ätherische Lösungen werden durch jede Säurespur carminrot gefärbt. Wie aus einer auf Wasser geschichteten, ätherischen Farbstofflösung beim allmählichen Zusatz von verdünnter Schwefelsäure der Farbstoff erst teilweise in Wasser übergeht, um dann bei etwas stärkerer Säurekonzentration wieder vollständig in den Aether zurückzukehren, ist auf pag. 58 ausführlich geschildert.

15. Bei Anwesenheit von überschüssigem, freiem Alkali (Ammoniak oder Natronlauge) löst sich Prodigiosin mit gelbbrauner Farbe in Wasser (wahrscheinlich Bildung von prodigiosinsaurem Salz). Zusatz von reichlichen Wassermengen, oder Abdampfen des Ammoniaks, oder partielle Sättigung des Alkalis durch Schwefelsäure oder Kohlensäure scheidet daraus entweder normales Prodigiosin oder einen nahe verwandten Körper — Paraprodigiosin — ab. Letzteres ist in Aether und alkalischem Wasser mit roter Farbe löslich, kann aber durch Einwirkung von Säure und vorsichtigem Uebersättigen der Säure mit Alkali wieder in normales Prodigiosin zurückverwandelt werden. Wann Paraprodigiosin statt Prodigiosin ausfällt, ist noch nicht ganz klar. Grosser Alkaliüberschuss und lange Wirkung des Alkalis begünstigt die Bildung desselben. (Pag. 59—63.)

16. In alkoholischer Lösung genügen sehr geringe Alkalimengen, um eine in der Lösung beständige, durch Wasser dissociirbare (s. oben) gelbe Verbindung des Prodigiosins hervorzubringen. — Auf rein gelbe ätherische Lösungen des Prodigiosins hat Alkali bei Abwesenheit von Wasser keinen merklichen Einfluss.

Bei Anwesenheit von Wasser und Schütteln genügen kleine Mengen Alkali (schon Würzburger Leitungswasser), um das Prodigiosin in rotes Paraprodigiosin überzuführen. (Pag. 63.)

17. In den übrigen üblichen organischen Lösungsmitteln löst sich Prodigiosin wie in Alkohol mit etwa granatroter Farbe. Ein sehr geringer Säuregehalt bringt eine reine Carminfärbung hervor. Nähere Studien verdient das Verhalten des Pigments zum Aceton und Essigäther. In letzterem ist die Lösung gelbbraun wie in Aether, währenddem in Aceton citronengelbe Lösungen erhalten wurden. Da unser Aceton gegen Lackmus und Rosolsäure schwach alkalisch, gegen Phenolphtalein sauer reagierte, so bleibt dahingestellt, in wie weit diese gelbe Farbe auf einer Acetonverbindung des Farbstoffes oder auf einer Verbindung mit einem in Aceton vorhandenen, alkalisch reagierenden Körper hindeutet. (Pag. 67—71.)

18. Die spectroscopischen Studien ergaben im Gegensatz zu den feinen Unterscheidungsversuchen *Rosenbergs,* dass das feste Prodigiosin, die roten Culturen, das Paraprodigiosin und die Lösung des Prodigiosins in sauren Medien gleiche Spectra haben. Ebenso hat die gelbe, alkalisch-wässerige Prodigiosinlösung und die gelbe ätherische oder Acetonlösung im wesentlichen das gleiche Spectrum. Das Spectrum der feuerfarbenen, alkoholischen Lösung steht in der Mitte zwischen den beiden genannten Typen. (Pag. 73—76.)

19. Das von uns untersuchte Prodigiosin enthielt nur etwas über 1 % Asche, in welcher Ammoniak,

Chlor, Phosphor, Natron und Eisen nachgewiesen wurden. (Pag. 77—80.)

20. Die Elementar-Analyse ergab im Gegensatz zu den Angaben von *Scheurlen* und in guter Uebereinstimmung von *Griffiths* einen Stickstoffgehalt von 3,9 %. Auch im Uebrigen stimmen meine Zahlen ziemlich gut mit den von *Griffiths* angegebenen überein. (Pag. 81—82.)

21. Die Resultate der Capillar-Analyse nach *Goppelsröder* sprechen durchaus dafür, dass wir in dem Prodigiosin einen einheitlichen Körper vor uns haben. (Pag. 83—88.)

Schlusswort.

Im Jahre 1896 hat *Scheurlen* die wichtigere Literatur über das Bacter. prodig. zusammengefasst und eine Reihe interessanter biologischer, morphologischer und chemischer Beobachtungen über unseren Organismus mitgeteilt. Ueber den Farbstoff selbst sind seine Angaben noch ausserordentlich dürftig. Er stellt denselben durch Eingiessen der alkoholischen, angesäuerten Lösung in Wasser dar, constatiert seine Unfähigkeit zu krystallisieren, macht wichtige Angaben über seine Löslichkeitsverhältnisse, beschreibt das Gelbwerden der roten Lösungen durch Alkali, findet den Farbstoff frei von Stickstoff und Phosphor und macht einige Mitteilungen über die sonstige elementare Zusammensetzung, die oben erwähnt ist.

Rosenberg hat im Jahre 1899 unter intensiver Mitarbeit von Professor *Lehmann* eine Reihe neuer Punkte

über den Farbstoff ermittelt und eine Anzahl von Beobachtungen kurz mitgeteilt, die in meiner Arbeit ausführlicher studiert sind. Namentlich sind schon wertvolle Beobachtungen über das Verhalten des Pigmentes zu Alkalien in der *Rosenberg'schen* Arbeit enthalten. Die Resultate, die er aus den spectroscopischen Beobachtungen gewonnen zu haben glaubte, haben unser Kritik in Einzelheiten nicht standgehalten. Uebrigens verfolgte die *Rosenberg'sche* Arbeit eine ganz andere Tendenz als unsere. Sie hat gezeigt, dass sich das Studium der Bacterienfarbstoffe für die bacteriologische Systematik nutzbringend verwenden lässt, und dass z. B. alle Prodigiosin liefernde Bacterien untereinander auf das Innigste verwandt sind.

Vergleicht man nun unsere Arbeit mit den beiden genannten, so wird, obwohl wir leider so manchen Punkt noch offen lassen mussten, der Fortschritt ein unverkennbarer sein. Neben den biologischen Resultaten, den unseres Wissens in diesem Umfange noch nicht durchgeführten Stoffwechselversuchen an einem Bacterium, haben wir auch in chemischer Beziehung eine Reihe ganz neuer Ergebnisse und Gesichtspunkte gewonnen.

Zu der Erkenntnis der ausserordentlichen Empfindlichkeit des Pigments gegen Säuren und Alkalien gesellt sich die wichtige Einsicht, dass das Wasser auf die Verbindung des Pigmentes mit Alkalien eine dissociierende Wirkung ausübt, und dass auch das Verhalten des Farbstoffes zu Alkohol und Aceton nur verstanden werden kann, wenn man sich des mächtigen Einflusses des Wassers auf diese Lösungen bewusst bleibt.

Durch die Entdeckung des Paraprodigiosins sind eine Reihe bisher gänzlich unverständlicher Beobachtungen in ein neues Licht gerückt worden. Die Elementar-Zusammensetzung des Prodigiosins, speciell der Stickstoffgehalt ist klargestellt worden, und durch die Capillar-Analyse die Einheitlichkeit des Farbstoffs bewiesen. —

So manche Vermutung und Hypothese, die in uns über den Farbstoff im Laufe der Arbeit auftauchte, müssen wir unterdrücken, da bisher die Mittel fehlen, sie kritisch zu prüfen. Immerhin dürfen wir hoffen, die Frage nach der Bildung und der Function eines interessanten Pflanzenfarbstoffs gefördert zu haben, wenn wir auch noch weit davon entfernt sind, eine abschliessende Darstellung geben zu können.

Bedenkt man aber, wieviele Forscher zusammen helfen mussten, um in jahrzehntelanger Arbeit allmählich z. B. die Eigenschaften und die Constitution des Chlorophylls aufzuklären, so wird man nachsichtig manche Unvollkommenheiten der vorliegenden Arbeit mit der Schwierigkeit solcher Probleme entschuldigen.

Zum Schluss erübrigt mir noch, Herrn Professor *Dr. K. B. Lehmann* sowohl für die Ueberweisung des Themas, wie namentlich für seine fortgesetzte, liebenswürdige Unterstützung bei meinen Versuchen und Schlüssen meinen besten Dank auszusprechen. Ganz besonders gilt dies von dem sehr schwierigen Abschnitt über die chemischen Eigenschaften des Pigmentes. Ich halte es für meine Pflicht, an dieser Stelle zu betonen, dass ich zu den dort mitgeteilten Ergebnissen ohne die Unterstützung des Herrn Professors nicht gekommen wäre.

Ebenso möchte ich mir erlauben, dem Vorstand des Chemischen Instituts der Universität, Herrn Professor *Dr. Hantzsch* für Ratschläge und freundliche Ueberlassung besonders gereinigter Chemikalien etc. meinen ganz verbindlichsten Dank hiermit auszusprechen.

Lebens-Lauf.

Geboren am 21. Oktober 1861 zu Hohenmölsen (Preussen) als Sohn des daselbst verstorbenen Schlossermeisters *Gustav Kraft* und seiner Ehefrau *Friederike* geb. *Thiele,* wurde ich in der dortigen evangelischen Kirche getauft. Vom 6.—15. Jahre besuchte ich die Volksschule daselbst. Alsdann nahm ich lateinischen und französischen Privat-Unterricht, wurde während der drei folgenden Jahre Schüler des Realgymnasiums zu Erfurt und trat hierauf in Frankenhausen-Kyffhäuser als Lehrling in die dortige Apotheke ein. Nach bestandener Gehilfenprüfung 1881 konditionierte ich in verschiedenen Städten Deutschlands, der Schweiz, Frankreichs und Italiens und studierte hierauf während dreier Semester 1888/89 an der Universität in Halle Pharmacie, wo ich folgende Herren hörte: Privatdozent *Dr. Baumert,* Prof. *Dr. Döbner,* Geh.-Rat Prof. *Dr. Knoblauch,* Prof. *Dr. Kraus,* Prof. *Dr. Volhard* und Prof. *Dr. Zopf.* Nach bestandenem Staatsexamen machte ich mich in Rotenburg a. F. ansässig und kaufte 1893 die Boxberger'sche Apotheke in Bad Kissingen, in welchem Jahre ich auch die bayerische

Staatsangehörigkeit erwarb. In den folgenden Wintern arbeitete ich in grösseren Laboratorien und Polikliniken zu Berlin und Moskau (Nahrungsmittelchemie und chem.-bacteriol.-medicin. Untersuchungen).

Während der letzten drei Semester studierte ich an der Würzburger Universität, arbeitete im Hygienischen Institute und hörte die Herren: Professor *Dr. Hantzsch,* Prof. *Dr. Kraus,* Prof. *Dr. Lehmann* und Prof. *Dr. Wien.* Die Doctorprüfung fand am 28. Mai 1902 statt.